

Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS
nel 2013 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 ANIMAL HEALTH ITALIA
 - VETOQUINOL ITALIA

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI 2013



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2013



XXXIX
MEETING ANNUALE
Piacenza

In copertina: *Suini a colloquio*, Nicoletta Belletti, www.bellettinicoletta.it

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2013

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XXXIX Meeting Annuale, Piacenza, 14-15 Marzo 2013.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2013.

ISBN 978-88-903311-5-2

INDICE

Prefazione	p. 21
------------------	-------

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO “ESTOTE PARATI”

Viareggio (LU), 25 Maggio 2012

<i>De Mia G. M.</i> Peste Suina Africana: una minaccia per l'industria suinicola mondiale	p. 25
<i>Feliziani F.</i> Peste Suina classica: passato, presente e futuro	p. 27
<i>Borla P., Boeri F.</i> Applicazione della metodologia dell'analisi del ciclo vitale (life cycle assessment - lca) al settore agro-alimentare	p. 29
<i>Schievano A., D'Imporzano G., Adani F.</i> Digestione anaerobica e settore zootecnico	p. 40

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO *Salsomaggiore Terme (PR), 5 Ottobre 2012*

<i>Burch D.</i> Perché la resistenza agli antibiotici nei suini non è così importante per la salute pubblica?	p. 45
---	-------

ATTI DEL XXXIX MEETING ANNUALE *Piacenza, 14-15 Marzo 2013*

TAVOLA ROTONDA **VIROSI EMERGENTI DEL SUINO**

<i>Tanja Opriessnig</i> Infezioni virali emergenti (o in alcuni casi insignificanti?) nei suini	p. 69
<i>Elena Canelli</i> Virus emergenti del suino: la situazione italiana	p. 76

TAVOLA ROTONDA
IL CINGHIALE COME POTENZIALE RISCHIO
PER L'ALLEVAMENTO SUINO

- Guberti V.*
Ecologia del cinghiale e rischi sanitari per gli allevamenti suinicoli p. 85
- Rugna G.*
Organizzazione e risultati dei piani di monitoraggio sullo stato sanitario
del cinghiale p. 89

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Bianco C., Sarli G., Panarese S., Bacci M.L., Galeati G., Dottori M.,
Bonilauri P., Lelli D., Leotti G., Vila T., Joisel F., Ostanello F.*
Effetto della vaccinazione anti-PCV2 sull'entità e durata dell'escrezione
virale nelle scrofe p. 99
- Bianco C., Felice V., Panarese S., Marrocco R., Ostanello F., Brunetti B.,
Muscatello L.V., Leotti G., Vila T., Francois J., Sarli G.*
Immunità mucosale specifica per PCV2 in scrofe convenzionali vaccinate
e non vaccinate p. 110
- Drigo M., Franzo G., Ceglie L., Gigli A., Martini M.*
Studio del fenomeno della ricombinazione tra stipiti di PRRSV circolanti
in allevamenti del Nord Italia p. 121
- Sensi M., Ivanov Y., Plavsic B.*
Peste suina classica (PSC) e biosicurezza: categorizzazione del rischio
negli allevamenti di suini in Serbia p. 128
- Scollo A., Tonon F., Contiero B., Mazzoni C.*
Effetti della somministrazione di tiamulina alle scrofe in sala parto: per-
formance dei suinetti p. 136
- Piancastelli C., Borri E., Catelli E., Mazzoni C.*
Il ruolo del colostro nell'incremento di peso vivo del suinetto durante le
prime 10 settimane di vita p. 145
- Salvini F., Guadagnini G., Bresaola M.*
Riforma delle scrofe entro il 3° parto: analisi economica p. 154

<p><i>Lonardi C., Tonon F., Mazzoni C., Rossi M., Gottardo F., Scollo A.</i> Valutazione di dolore e stress durante la castrazione dei suinetti: analgesia preventiva con acido tolfenamico</p>	p. 160
<p><i>Vio D., Ustulin M., Barco L., Zambon P., Rigo S., Perosa G., Tagliente D., Brunetta C., Pinzin V., Re E., Palei M., Conedera G.</i> Epidemia causata da <i>Salmonella choleraesuis</i> in cinghiali della provincia di Pordenone</p>	p. 167
<p><i>Foni E., Garbarino C., Chiapponi C., Cordioli P., Baioni L., Zanni I.</i> Indagine sulla circolazione del virus influenza A nella popolazione di cinghiali delle provincie di Parma e Piacenza</p>	p. 175
<p><i>Di Martino G., Zuliani F., Buniolo F., Guerrini E., Citterio C., Granzotto F., Rebecchi L., Adami S., Guberti V., Bonfanti L.</i> Monitoraggio della malattia di Aujeszky in popolazioni di cinghiali (<i>sus scrofa</i>) della Regione Veneto</p>	p. 186
<p><i>Costarelli S., Caporali A., Pellegrini C., Paniccià M., Pauselli G., Moriconi L., Giannelli R., Boni M., Sensi M.</i> Indagine sullo stato sanitario di allevamenti umbri outdoor attraverso monitoraggio sierologico</p>	p. 194
<p><i>Sebastiani C., Cucco L., Ciullo M., Maresca C., Scozzia E., Tartaglia M., Magistrali C.F.</i> Valutazione di un test di PCR real-time per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso</p>	p. 203
<p><i>Argüello H., Carvajal a. aller L.M., Diaz J., Rubio P.</i> Sensibilità di ceppi spagnoli clinici di <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> agli antibiotici</p>	p. 212
<p><i>Ferraro G., Zoppi S., Dondo A., Tron S., Burzio G., Giacomino F., Gorla M.</i> <i>Mycobacterium avium complex</i> in suini: indagini preliminari in Piemonte</p>	p. 218
<p><i>Zoppi S., Vitale N., D'Errico V., Giorgi I., Perosino M., Sona B., Chiavacci L., Baricco G., Dondo A.</i> Dinamica d'infezione di <i>Mycobacterium avium subspecies avium</i> in un allevamento suino a gestione multisito</p>	p. 229

POSTER

Bongiovanni E., Minelli G., Luppi A., Martelli P.

Valutazione di due approcci metafilattici nel controllo della malattia respiratoria del maiale p. 239

Ferrarini G., Ferrari L., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P.

Studio molecolare sulla risposta infiammatoria e immunitaria in corso di infezione naturale da *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) p. 246

Llopart D., Rodriguez I., Torrents D., Rolla G.

Interpretazione dei Serumprofili come strumento per definire il programma di controllo della PRRSL p. 259

Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Rugna G., Dottori M.

Polmonite enzootica: aggiornamento sul monitoraggio delle lesioni broncopolmonari in suini macellati p. 261

PREMIO GUADAGNINI

Bucci D., Galeati G., Tamanini C., Vallorani C., Rodriguez-Gil J. E., Spinaci M.

Effetto del sex-sorting su alcuni parametri funzionali degli spermatozoi di verro p. 269



Ci prendiamo cura dei vostri animali da reddito come fossero i nostri.

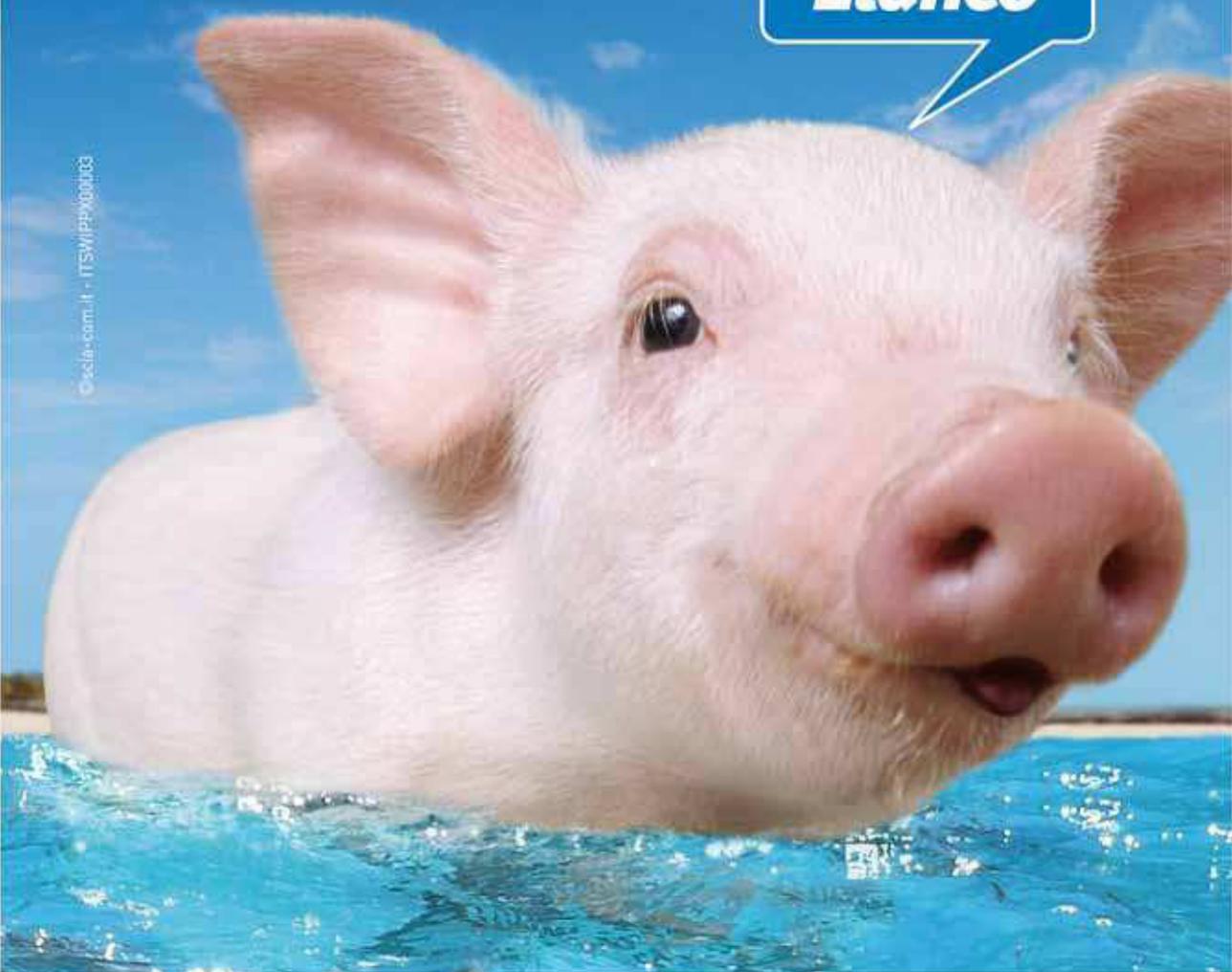
La redditività di un moderno allevamento zootecnico dipende in larga misura dalla salute e dal benessere degli animali.

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, ed assicurare ai vostri animali da reddito un ambiente di vita più salubre. Come fossero i nostri.

Boccata d'aria

Grazie,
Elanco

© scia.com.it - ITSW/PP0000103



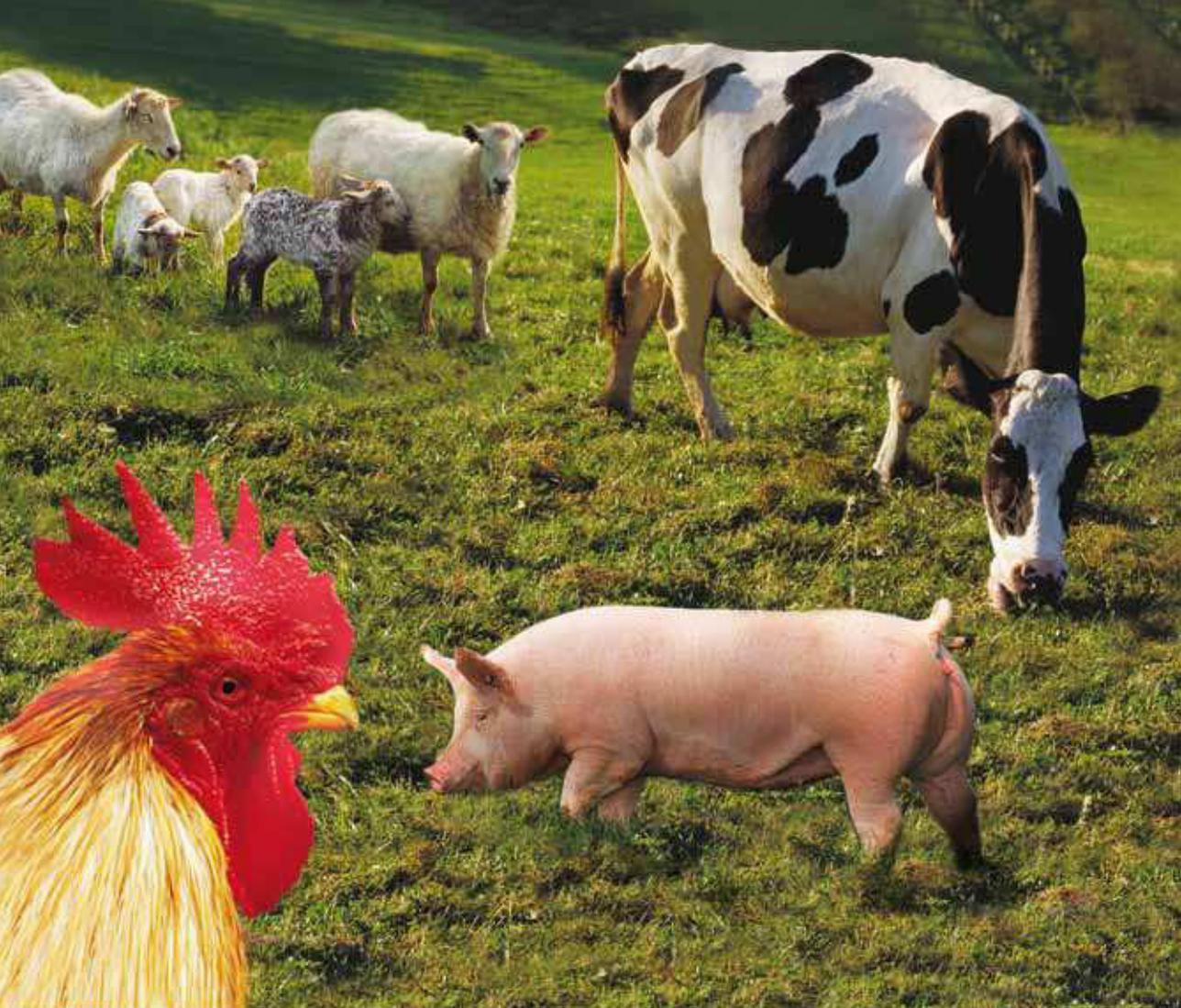
Elanco™



El 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**

Prevenzione e Terapia

100%

Made in Italy



**FATRO, farmaci e vaccini
studiati, testati e prodotti in Italia**



la salute animale per la salute dell'uomo

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

Insieme, oltre la salute animale





chemifarma[®] S.p.A.
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Il tuo partner
in terapia veterinaria
e nutrizione animale



Terapia
Veterinaria



Nutrizione
Animale



Linea
Disinfettanti

Distributore esclusivo per l'Italia:



Visita il NUOVO sito web!

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

**massima
protezione**

**perfetta
miscelazione**



Più spazio per una facile miscelazione



Riprendi il controllo contro le infestazioni da *ascaridi*

Per una disinfestazione efficace
usa un prodotto

- | | |
|--------------------------|---|
| stabile ed omogeneo | > nessun rimescolamento aggiuntivo |
| con efficacia dimostrata | > elimina tutti gli stadi*, per un controllo ottimale |
| semplice e veloce | > risparmio di tempo |

* in vitro

- Rapido ed elevato ritorno dell'investimento
- Riprendi in mano il controllo della lotta ai parassiti

**Chiedi al tuo
Medico
Veterinario
di FIDUCIA!**



Farmaceutici Gellini divisione di
MSD ANIMAL HEALTH S.r.l.
Centro Direzionale Milanodue - Palazzo Canova
Via Fratelli Cervi snc - 20090 Segrate (Milano)

PREFAZIONE

Cari amici,

come ogni anno ci ritroviamo per il Meeting Annuale della nostra Società, giunto in questo arcigno 2013 alla sua 39° edizione: la SIPAS comincia ad essere ed apparire come una di quelle quarantenni certo ancora piacenti, le quali tuttavia portano su di sé i primi, inequivocabili, segni del trascorrere del tempo.... sono successe delle cose!

La patologia e l'allevamento del suino, in questi ultimi anni, hanno progressivamente visto impallidire (se mi passate il termine) gli stilemi più classici della loro storia, basati come è ovvio sulla lotta alle grandi patologie da un lato, e sulla ricerca della massima produttività dall'altro, per vederli arricchiti da temi più "etici", come l'attenzione al benessere degli animali, alla qualità dei prodotti da loro ottenuti, ed alla contemporanea contestualizzazione degli argomenti specificatamente prossimi alla patologia nel più moderno concetto di "one health", in base al quale ogni evento che si osserva e viene affrontato in allevamento deve necessariamente confrontarsi non solo con le ovvie ricadute "interne" (riguardanti cioè gli animali oggetto dell'evento) ma anche con le conseguenze, anche solo potenziali, che gli interventi effettuati hanno o possono avere sulla salute degli umani e sulla conservazione dell'ambiente.

Il tema della attenzione ai fenomeni di antibioticoresistenza, di cui la SIPAS si è occupata e si occuperà, è un buon esempio di questo nuovo approccio alla professione medica in ambito di allevamenti industriali.

Il tempo dell'uso allegro degli antibiotici, della loro prima scelta come strumento di risoluzione dei problemi, è definitivamente tramontato!

L'impostazione data dal nostro Ministero alla questione, basata sul principio di promuovere e favorire una professionalità medica esercitata "sotto tutela" al posto del perseguimento di un maggior grado di formazione e di consapevolezza da parte della categoria nel pieno rispetto della scienza e della coscienza di ogni singolo veterinario, mi vede ovviamente contrarissimo, ma, essendo chi vi scrive ben lontano dai centri del potere e completamente scollato dai luoghi dove si può ciò che si vuole, questa contrarietà ovviamente non conta nulla.

A questa situazione (nel lungo periodo) c'è in realtà una sola risposta: essere più bravi, studiare ed aggiornarsi di più e meglio, non dare mai nulla per acquisito e scontato, pretendere da sé stessi, ogni giorno, qualcosa in più e di meglio di quel che si è stati in grado di dare il giorno prima.

Sogni di un vecchio zio un pò rimbambito?

Non credo, non lo credo proprio: e traggio questa convinzione, badate, non da un astratto senso di ottimismo viscerale, quanto dalla frequentazione di tanti giovani colleghi, dalla ammirata scoperta della loro intelligenza, della loro sensibilità e preparazione, della loro voglia di imparare e approfondire.

Le cose cambiano, e voi, le generazioni più giovani, siete quelli che ne guiderete e ne gestirete il percorso di cambiamento (mentre scrivo queste cose, nella testa, come una reazione automatica da vecchio musicista sessantottino, echeggia Bob Dylan, The times they are 'a changing ... se avete voglia sentitelo anche voi, non sarà tempo perso : <http://www.youtube.com/watch?v=YyXHk6lzMac>) ; la SIPAS, coerentemente alla propria storia, cerca di essere uno strumento di questo processo, proponendo informazioni, stimolando le idee e promuovendone il confronto, accogliendo con

benevolenza chi, superata la naturale ritrosia che spinge ad osservare gli eventi dal comodo bozzolo dell'invisibilità, offre il contributo dei propri studi e riflessioni nelle comunicazioni scientifiche.

Quest'anno decade il Consiglio Direttivo, è tempo di elezioni: al nuovo Consiglio il più sincero e caloroso augurio di buon lavoro, insieme all'informazione che non mancherà, se richiesto, l'aiuto e il supporto da parte di chi oggi cede il testimone.

Al Consiglio uscente, in primis al carissimo Presidente Prof. Paolo Martelli, ma anche a tutti gli altri amici, penso mi consentirete, cari Soci, di associare al mio anche il Vostro riconoscente ringraziamento per sei anni di eccellente lavoro.

Le Industrie di Salute Animale che anche quest'anno non ci fanno mancare il supporto economico, e questo, in tempi di "maiali magri" come quelli che stiamo vivendo, è un segno di fiducia e di lungimiranza che non dimenticheremo e di cui pubblicamente vogliamo esporre ringraziamento.

Alla famiglia Montanari la riconoscenza per il prezioso lavoro di supporto organizzativo, e la affettuosa vicinanza degli amici, che si deve far sentire più calda nei momenti difficili.

A tutti Voi, cari Soci, l'augurio di un magnifico Meeting 2013 e l'augurio di una proficua lettura di questo Volume degli Atti.

Piacenza, 14 Marzo 2013

Il Consigliere Decano
Giuseppe Baricco



ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

"ESTOTE PARATI"

Viareggio (LU), 25 Maggio 2012

PESTE SUINA AFRICANA: UNA MINACCIA PER L'INDUSTRIA SUINICOLA MONDIALE

GIAN MARIO DE MIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Perugia (Italy)

La Peste suina africana (PSA) è stata descritta per la prima volta in Kenya nel 1921 e per molto tempo è rimasta confinata nel territorio africano. L'infezione è presente in forma endemica nella fascia sub-sahariana, ma non ha risparmiato aree più a sud, tra le quali anche l'isola del Madagascar. A partire dagli anni '50, si sono registrati eventi epidemici anche al di fuori del continente africano, dapprima in Europa (nel 1957 in Portogallo, nel 1960 in Spagna, nel 1964 in Francia, nel 1967 in Italia) e successivamente, a cavallo degli anni '80, in Brasile, Cuba, Repubblica Dominicana e Haiti. Negli anni '90, si sono avute sporadiche segnalazioni di malattia in Portogallo e in Olanda. La situazione endemica in Sardegna, dove la PSA è presente in forma continuata dal 1978, è stata a lungo considerata a sé stante perché, grazie alle misure restrittive intraprese, l'infezione è rimasta sempre confinata nell'isola. Allo stato attuale la PSA è stata eradicata con successo da tutti i paesi della UE, con l'eccezione della sola Sardegna. Recentemente però, la malattia è stata segnalata in diverse zone del Caucaso e in Russia, destando grande preoccupazione per il rischio potenziale di introduzione in UE. Per tali ragioni la PSA viene attualmente considerata una malattia riemergente. Sino ad ora tutti i tentativi di vaccinazione hanno avuto esito negativo. Da ciò scaturisce la necessità di una diagnosi rapida ed accurata che è determinante per un controllo efficace della malattia. La PSA è una malattia virale che colpisce suino domestico e suidi selvatici, caratterizzata da elevata morbilità e mortalità. L'agente causale è un virus DNA dotato di involucro. Può essere albergato e trasmesso da zecche del genere *Ornithodoros*, tuttavia in Sardegna la presenza di tali zecche non è mai stata segnalata. Il virus è molto resistente e molto stabile soprattutto alle variazioni di pH. Nelle carcasse e nei prodotti a base di carne i virioni permangono infettanti per mesi. Il genoma virale, costituito da DNA bicatenario della lunghezza di circa 170-180 kb, e può presentare addizioni o delezioni dell'ordine di 10-20 kb, grazie alle quali si è evidenziata una grande variabilità genetica tra stipiti. Prima della sua comparsa in Europa, la PSA era presente in Africa sotto forma di infezione subclinica nei suidi selvatici locali (facoceri e potamoceri) e nelle zecche, nelle quali il virus può permanere anche per anni. I facoceri sono considerati i principali portatori del virus nelle regioni ove il loro numero è consistente, potendo contrarre l'infezione molto precocemente ed in forma del tutto asintomatica. In Sardegna, in assenza di zecche, la trasmissione si realizza esclusivamente per contatto diretto per via oro-nasale, oppure per contatto indiretto attraverso la somministrazione di residui di cucina infetti o tramite oggetti o veicoli da trasporto contaminati. Nella patogenesi della malattia, le tonsille e i linfonodi mandibolari costituiscono il primo sito di replicazione virale quando l'infezione viene contratta per via oro-nasale. Successivamente il virus viene reperito nel sangue (fase viremica) dove raggiunge in pochi giorni titoli elevati replicando attivamente nei monociti e nei polimorfonucleati. Con il sangue perviene quindi in tutti gli organi e tessuti a partire dal midollo osseo, dalla milza e dai linfonodi. Cellule bersaglio sono rappresentate dai macrofagi, dalle cellule reticolari ed endoteliali. Clinicamente la PSA si manifesta come una malattia febbrile della quale sono possibili forme diverse: iperacuta, acuta e cronica, oppure asintomatica. Il decorso dipende dal tipo di virus, è però determinato anche dall'età e dalla razza dei suini colpiti. Il periodo d'incubazione è di 4-19 giorni. Il decorso acuto è caratterizzato da febbre alta persistente e

da casi di morte improvvisa con tassi di mortalità anche vicini al 100%. La cute, i reni, le sierose e i linfonodi possono presentare emorragie puntiformi o più estese. Spesso la milza è molto gonfia, di colore rosso scuro e di consistenza friabile. I linfonodi gastroepatici e quelli renali possono essere fortemente ingrossati e presentare anch'essi una colorazione rosso scura. Nel decorso cronico, il quadro clinico è caratterizzato da sintomi aspecifici e, talvolta, il dimagrimento è l'unico sintomo rilevabile. Altre volte si sono manifestate lesioni articolari (tumefazioni a carico del carpo e del tarso) o cutanee (processi ulcerativo necrotici). Un ruolo epidemiologico importante viene rivestito dai portatori sani. Si tratta di soggetti che, contratta l'infezione, non hanno presentato una sintomatologia clinica manifesta oppure, sopravvissuti alla malattia, continuano ad albergare il virus nel proprio organismo. Le modificazioni della virulenza subite dal virus lungo decenni in Europa, hanno portato ad un incremento delle forme sub-acute e croniche caratterizzate da mortalità ridotta. Conseguentemente è andata aumentando la comparsa di soggetti portatori, il cui ruolo nella diffusione della PSA è di notevole importanza. Infatti si è visto che questi soggetti possono andare incontro a fenomeni di riattivazione dell'infezione con sintomi di malattia più o meno manifesti e comunque, in grado di disseminare il virus nell'ambiente per periodi anche lunghi. Sembra che la riacutizzazione possa avvenire a seguito di eventi stressanti o essere indotta da farmaci, come i cortisonici. La risposta immunitaria è protettiva e duratura ed è correlata ad una serie di fenomeni assai complessi ed ancora non del tutto conosciuti. Sta di fatto che, ad oggi, non esistono ancora presidi immunizzanti validi ed efficaci nei confronti di questa malattia. Nella resistenza nei confronti del virus sembra inoltre che giochi un ruolo importante oltre all'immunità umorale anche l'immunità cellulare. Singolare è anche il fatto che gli anticorpi protettivi non appartengono alla classe degli anticorpi neutralizzanti. Il virus infatti non ne induce la formazione e questo fa sì che per la diagnosi sierologica di questa malattia non possa essere impiegata la prova di sieroneutralizzazione. In sede di diagnosi differenziale devono essere prese in considerazione tutte le cosiddette "malattie rosse" del suino, a cominciare dalla Peste Suina Classica che è praticamente indistinguibile e per la quale si rende quindi necessaria la diagnosi di laboratorio. La conoscenza degli aspetti fondamentali dell'infezione è essenziale per una formulazione veloce del "sospetto" e per la conseguente riduzione del periodo a rischio, su cui si basano le misure per una pronta eradicazione della malattia.

PESTE SUINA CLASSICA: PASSATO, PRESENTE E FUTURO

F. FELIZIANI

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

La Peste Suina Classica (PSC) colpisce suini domestici e selvatici ed è sostenuta da un pestivirus. Le caratteristiche di morbilità e mortalità ne fanno una delle malattie più temute dai veterinari e dagli allevatori, perciò la PSC è unanimemente considerata una delle infezioni transfrontaliere da tenere sotto costante controllo.

L'Italia ha sospeso la vaccinazione nel 1991 per applicare, in base alla normativa europea, una strategia di controllo fondata sulla sorveglianza primaria e lo stamping out degli eventuali focolai di infezione. L'ultimo focolaio denunciato in Italia è occorso nel 2003 in Sardegna, ma negli anni novanta diverse sono state le emergenze causate dal virus della PSC. In particolare, l'epidemia del 1997 ebbe origine in Olanda e coinvolse diversi stati europei toccando anche il nostro paese con due focolai tra loro collegati. Nello stesso periodo la PSC è stata segnalata anche nelle popolazioni selvatiche: numerosi focolai hanno colpito diverse zone della Germania sconfinando in Francia, in Belgio e Lussemburgo, ma anche in Italia il virus ha infettato i cinghiali in provincia di Varese, di Piacenza e in Sardegna.

Attualmente l'infezione da PSC è stata eradicata dall'Europa occidentale, ma diversi focolai si registrano nell'Europa dell'Est. I paesi recentemente ammessi o comunque candidati ad entrare nell'Unione Europea hanno dovuto applicare rigidi piani di controllo e hanno potuto sensibilmente migliorare la situazione epidemiologica che invece appare ancora critica nella Repubblica Russa e nelle repubbliche ex sovietiche.

Di norma, l'introduzione del virus della PSC in una popolazione suina recettiva, genera una diffusione della malattia eclatante e rapida. Il periodo di incubazione varia da 3 a 14 giorni; nella forma acuta i suini infetti presentano febbre elevata che persiste a lungo, depressione ed anoressia. I soggetti ammalati tendono ad aggrupparsi. Possono presentare congiuntivite, scolo nasale, costipazione seguita da diarrea, vomito e cianosi. Sintomo costante è rappresentato da atassia e successivamente paresi del treno posteriore; il decorso clinico va in genere dai 6 ai 16 giorni e la mortalità raggiunge il 90-100%. Nelle forme subacute i sintomi sopra descritti possono diminuire di intensità e gli animali in genere, vengono a morte dopo 3-4 settimane. Infezioni secondarie possono complicare il quadro clinico; il tasso di mortalità è piuttosto variabile.

Nelle forme di infezione intrauterina, soprattutto quando questa si verifica nell'ultimo mese di gravidanza ed è sostenuta da stipiti a bassa patogenicità, accanto a suinetti nati sani, se ne osservano altri poco vitali o affetti da tremori. In questi soggetti, che possono sopravvivere fino a 5-6 mesi, si riscontra viremia persistente. Talvolta, in queste forme di infezione, l'unica manifestazione apprezzabile è un evidente ritardo nella crescita. Alcuni soggetti, superata una prima fase acuta di malattia e dopo un apparente miglioramento, vanno incontro a forme croniche di PSC mostrando condizioni generali scadenti. È frequente il riscontro di bassi titoli anticorpali che non impediscono l'eliminazione di virus nell'ambiente. I suini cronicamente infetti possono sopravvivere anche per alcuni mesi: questi soggetti sono da ritenere pericolosi diffusori del virus.

Anche ai fini di una corretta diagnosi differenziale, è sempre opportuno rivolgersi al laboratorio in caso di sospetto di Peste Suina. La ricerca degli antigeni virali può essere effettuata attraverso prove di immunofluorescenza diretta oppure mediante test ELISA Antigene che consentono di evidenziare il virus negli organi e nei tessuti; in alternativa è possibile tentare l'isolamento

virale attraverso inoculazione di colture cellulari. Attualmente viene anche correntemente impiegata la prova della reazione a catena della polimerasi (PCR) che consente, attraverso la ricerca dell'acido nucleico del virus, una diagnosi eziologica in poche ore anche a partire da materiali mal conservati che poco si addicono all'isolamento su colture cellulari.

Nel caso di infezioni croniche o atipiche, le prove sopradescritte potrebbero risultare difficoltose. In tali circostanze e qualora la popolazione suina non fosse sottoposta a vaccinazione, la ricerca di anticorpi dal siero può costituire un valido ausilio diagnostico. Tale ricerca viene effettuata con il metodo immunoenzimatico (ELISA) o attraverso il test di sieroneutralizzazione, utile soprattutto nel caso in cui è necessario differenziare gli anticorpi nei confronti del virus della PSC da quelli verso gli altri pestivirus correlati.

L'esperienza insegna che il riscontro dell'infezione nei suini domestici causa enormi perdite economiche dovute anche alla politica dello stamping out che, in ambito europeo, è stata talvolta applicata non solo ai suini riconosciuti infetti, ma anche a quelli sospetti di infezione. Questi interventi pur se criticati per gli alti costi ed ancor più per motivi etici, si sono rivelati efficaci ed adeguati ad estinguere i focolai di infezione in un tempo limitato e comunque utile per evitare l'endemizzazione dell'infezione.

Capitolo a parte meritano le diverse strategie di controllo che sono state sperimentate nelle popolazioni di suini selvatici. Il sistema del depopolamento è stato applicato in alcune occasioni non solo in Italia, ma anche nel resto d'Europa. Si è però dovuto constatare che questa misura non è stata pienamente efficace e addirittura diversi studi dimostrano che la caccia in zone infette può favorire l'endemizzazione dell'infezione. In alcuni particolari contesti è stata applicata la strategia che, in termini anglosassoni, viene definita del "sit and wait". È ormai accertato che l'infezione da virus PSC tende ad auto estinguersi in popolazioni di cinghiali residenti in ambienti naturalmente delimitati da barriere naturali che impediscano il contatto con altri gruppi recettivi. Diverse sono comunque le variabili legate all'ospite, al parassita e all'ambiente che possono condizionare e prolungare il tempo di estinzione dell'infezione la quale rappresenta un rischio non accettabile per le popolazioni di suini domestici vicini.

È opportuno ricordare che la legislazione europea prevede la possibilità di ricorrere alla vaccinazione in caso di emergenza, ma in realtà questa opzione non è mai stata applicata. Storicamente nei confronti della PSC è stato usato un vaccino vivo modificato capace di indurre una solida immunità protettiva; i soggetti vaccinati, da un punto di vista sierologico, sono però indistinguibili da animali venuti a contatto con il virus selvaggio e questo aspetto rappresenta il limite più rilevante del vaccino tradizionale. Questo presidio immunizzante, distribuito in forma orale, è stato anche utilizzato per controllare l'infezione in alcune popolazioni di suini selvatici della Germania.

Recentemente, sono stati sviluppati vaccini, derivanti dall'ingegneria genetica, che consentono di differenziare soggetti vaccinati da quelli infetti. Dopo diversi studi effettuati su suini domestici, questa tecnologia (DIVA) è in corso di sperimentazione anche in popolazioni di suini selvatici.

Di fatto la PSC rappresenta ancora un pericolo per le popolazioni suine e quindi è opportuno non abbassare la guardia nei confronti di questa temibile infezione. La presenza di focolai nei paesi dell'Est Europa, impone la messa a punto di strategie di prevenzione basate su specifici piani di pronto intervento; per limitare i danni in caso di reintroduzione della PSC è fondamentale riconoscere rapidamente la malattia in modo da rendere rapidamente disponibili tutte quelle misure previste come utili ad arginare l'infezione. Il concetto dell'early warning è quindi alla base della prevenzione dei danni da PSC nel prossimo futuro anche nel nostro paese.

APPLICAZIONE DELLA METODOLOGIA DELL'ANALISI DEL CICLO DI VITA (LIFE CYCLE ASSESSMENT – LCA) AL SETTORE AGROALIMENTARE

BORLA P., BOERI F.,

Life Cycle Engineering (LCE), Torino, Italy

Parole chiave: Impatto ambientale, Analisi del ciclo di vita, filiera agroalimentare

RIASSUNTO

La metodologia LCA (Life Cycle Assessment) è stata utilizzata per la valutazione dell'impatto ambientale del ciclo di vita di tre prodotti diversi appartenenti alla filiera agroalimentare, partendo dalla coltivazione del grano per la produzione della pasta, passando per l'utilizzo del grano per l'allevamento dei maiali, per concludere con la lavorazione della carne di maiale per la produzione del prosciutto cotto. Per quanto riguarda il settore agricolo, è stato analizzato il sistema di coltivazione del grano e il processo di produzione della pasta Barilla, evidenziando come il carico ambientale maggiore sia dovuto alla fase di coltivazione delle materie prime. Per l'analisi del settore dell'allevamento, si è fatto riferimento allo studio condotto da Pfizer sull'allevamento di maiali vaccinati contro l'odore di ferro per la produzione di carne ed è emerso che le fasi maggiormente impattanti dal punto di vista dell'effetto serra sono la razione di alimenti somministrati ai suini e la gestione delle deiezioni. Per quanto riguarda la fase di lavorazione della carne suina da uno studio effettuato su un salumificio è emerso che il processo contribuisce all'impatto solo per il 17% circa.

Partendo da questi dati sono stati valutati scenari differenti di riduzione dell'impatto che possano agire lungo tutta la filiera agroalimentare..

INTRODUZIONE

Con il termine LCA si intende la metodologia utilizzata per la valutazione degli aspetti ambientali e dei potenziali impatti sull'ambiente associati ad un processo o prodotto, attraverso l'analisi delle materie in ingresso ed in uscita dal sistema.

Il risultato dell'analisi del ciclo di vita viene espresso attraverso indicatori ambientali aggregati, come l'Impronta di Carbonio (Carbon Footprint o Global Warming Potential – potenziale effetto serra), o il consumo di energia cumulativa (il cosiddetto Gross Energy Requirement) e viene spesso utilizzato per:

- comparare prodotti diversi sulla base di dati generati scientificamente;
- identificare le aree di interesse per il settore ricerca e sviluppo
- simulare degli effetti correlati a modifiche di processo;
- comunicare i risultati ambientali utilizzando informazioni dettagliate, affidabili e robuste;
- sviluppo di simulazioni di ecodesign al fine di sostenere le modifiche del sistema a scopo migliorativo.
- sviluppo attività di comunicazione ambientale.

Un'esempio di comunicazione basata sull'analisi LCA è rappresentata dal sistema EPD (Environmental Product Declaration); in quest'ottica, i risultati dell'analisi vengono utilizzati per la redazione delle Dichiarazioni Ambientali di Prodotto che quantifica le informazioni ambientali legate al ciclo di vita di un prodotto (non è un'etichetta di tipo selettivo, ma informativo).

Il sistema è regolato dallo standard internazionale ISO 14025, che stabilisce i principi e le procedure specifiche per lo sviluppo delle dichiarazioni ambientali di Tipo III

Tra gli indicatori contenuti nelle EPD è compreso il Carbon Footprint o Global Warming Potential che rappresenta la quantità totale di gas a effetto serra (GHG) emessi sia direttamente che indirettamente dal sistema analizzato; tale indicatore è espresso in kg di CO2 equivalente.

In questo lavoro sono riportati i risultati di alcuni studi di tipo Life Cycle Assessment (Analisi del ciclo di vita) applicati al settore agroalimentare nonché l'analisi dei potenziali di miglioramento sull'impatto ambientale ad esso associato.

MATERIALI E METODI

La metodologia LCA (Life Cycle Assessment) è basata sugli standard della serie ISO 14040 e si suddivide in 4 fasi:

1. Definizione di scopi e obiettivi: fase preliminare che comprende la definizione delle finalità dello studio, dell'unità funzionale e dei confini del sistema analizzata.
2. Analisi d'inventario: parte dedicata alla raccolta dati, allo studio del ciclo di vita del prodotto/processo e alla costruzione del modello analogico del sistema reale
3. Analisi degli impatti: studio dell'impatto ambientale correlato al sistema analizzato
4. Interpretazione e miglioramento: parte conclusiva dello studio con lo scopo di analizzare e proporre gli eventuali cambiamenti necessari alla riduzione dell'impatto del processo o del prodotto considerato.

Focalizzando l'attenzione al settore agroalimentare ogni elemento della catena è stato analizzato dal punto di vista del ciclo di vita (dalla produzione delle materie prime al prodotto finito) definendo altresì la relativa Unità Funzionale (Unità di riferimento a cui sono rapportati i risultati dell'analisi) e i confini del sistema da analizzare; a titolo esemplificativo, in Figura 1 si riportano i confini del sistema correlati alla produzione della pasta.



Figura 1. Schema generale dei Confini del Sistema correlato alla produzione della pasta

SETTORE AGRICOLO

Per quanto riguarda il settore agricolo l'attenzione è stata focalizzata sull'analisi del ciclo di vita per la produzione della pasta Barilla, partendo dalla coltivazione del grano per arrivare alla fase d'uso del consumatore in accordo con quanto riportato nella EPD n° S-P-00217, pubblicata dal International EPD® System (<http://www.environdec.com>).

L'Unità Funzionale è rappresentata 1 kg di pasta mentre i confini del sistema (Figura 2) comprendono la coltivazione delle materie prime (grano), i processi di macinazione del grano, la produzione della pasta, la produzione dell'imballaggio e la fase di confezionamento, il trasporto del prodotto finito, la fase di cottura della pasta e il fine vita dei materiali di imballaggio.



Figura 2. Schema illustrativo del sistema pasta.

Per quanto concerne la raccolta dati utilizzati nello sviluppo dello studio LCA è opportuno evidenziare i seguenti aspetti:

- I dati relativi alla coltivazione delle materie prime, con particolare riferimento alle rese, ai consumi di fertilizzanti e di acqua, derivano dai fornitori di grano Barilla.
- Le prestazioni ambientali dei mulini e degli stabilimenti sono state valutate raccogliendo le informazioni presso i siti di produzione della pasta con particolare riferimento al consumo di energia, risorse idriche e materiali ausiliari.
- Per quanto riguarda l'imballaggi i dati riferiti alle tipologie di materiali alla loro produzione sono stati raccolti presso fornitori Barilla;
- Infine per quanto concerne i consumi legati alla cottura della pasta e il fine vita della confezione sono state fornite soltanto informazioni qualitative, dal momento che sono azioni strettamente dipendenti dalle abitudini del consumatore, ma forniscono comunque un'indicazione dell'apporto di queste fasi all'impatto globale del prodotto finito (1 kg di pasta).

L'analisi è stata effettuata sulla base di tre indicatori ambientali aggregati:

- Carbon footprint: quantità totale di gas ad effetto serra emessi direttamente e indirettamente nell'ambito delle diverse fasi comprese nei confini del sistema;
- Ecological Footprint: Misura degli appezzamenti di terreno o della superficie marina biologicamente produttivi necessari per rigenerare le risorse consumate e bilanciare gli impatti generati .
- Water footprint : misura il consumo di acqua in termini di volumi utilizzati e/o inquinati per unità di tempo lungo il ciclo di vita di un prodotto;

I risultati ottenuti (Tabella 1) mostrano che l'impatto maggiore è sempre dato dalla fase di coltivazione delle materie prime, portando la fase di processo in stabilimento in secondo piano.

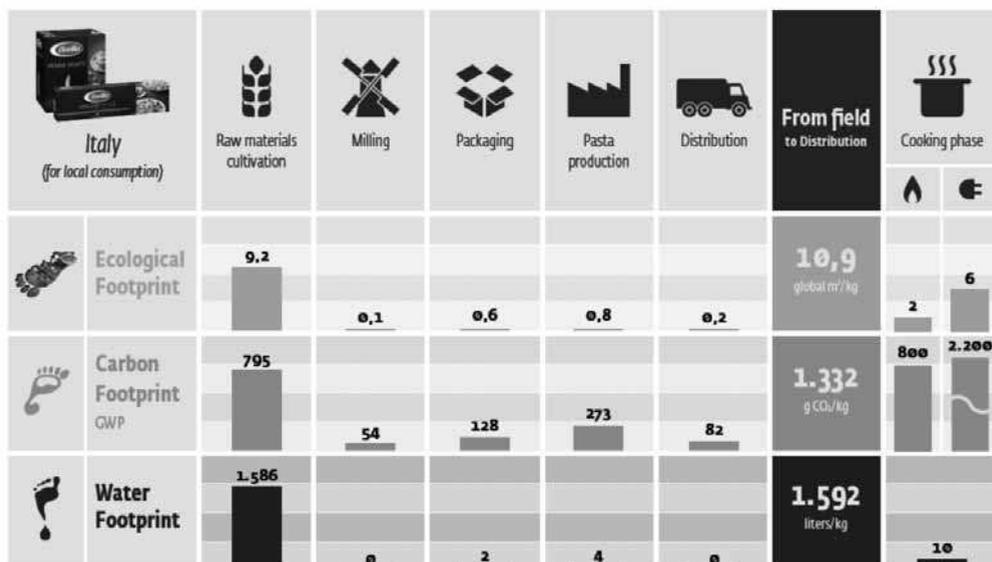


Tabella 1. Impatti ambientali potenziali del sistema di produzione della pasta.

Focalizzando l'attenzione ai contributi relativi all'indicatore Carbon Footprint possono scaturite azioni di miglioramento in ottica di riduzione delle emissioni di gas serra. Una delle azioni di miglioramento adottate da Barilla si riferisce alla coltivazione del grano: per rendere i sistemi agricoli del grano duro maggiormente sostenibili sono stati studiati diversi scenari di coltivazione al fine di individuare delle azioni e buone pratiche per la sostenibilità da diffondere presso i fornitori mediante la redazione del *Decalogo per la coltivazione del grano duro*.

SETTORE ALLEVAMENTO

Per quanto riguarda il settore allevamento di seguito sono presentate alcune valutazioni emerse a seguito di un studio sviluppato in riferimento all'allevamento di suini.

In particolare la metodologia LCA è stata applicata alla valutazione dell'impatto ambientale della produzione di carne di maiale e all'analisi degli effetti associati all'uso di un prodotto immunologico contro l'odore di ferro (attualmente eliminato attraverso pratiche di castrazione fisica del lattonzolo); per maggiori dettagli si rimanda all'EPD sviluppata da Pfizer n° S-P-00261 e pubblicata dall'International EPD® System (<http://www.environdec.com>).

Nell'ambito dello studio sono state considerate due unità funzionali ovvero la dose di prodotto immunologico somministrato e il kg di suino (peso vivo) che arriva al macello; i risultati sono stati successivamente valutati anche in riferimento al prodotto dopo la fase di macellazione. (1 kg di carcassa e 1 kg di carne).

Dal punto di vista metodologico, il sistema analizzato nello studio LCA parte dalla produzione delle materie prime necessarie alla produzione del prodotto immunologico e finisce con la fase di macellazione del suino. Lo studio è basato sui sottoinsieme mostrati in figura 3:

1. Il processo a monte (Upstream) include la produzione dei componenti usati per il prodotto immunologico ed il materiale per l'imballaggio
2. Il processo produttivo vero e proprio (core) tiene in conto tutti gli step relativi alla produzione in stabilimento del prodotto
3. Il processo a valle (downstream) include l'allevamento del suino in fattoria, l'utilizzo del prodotto immunologico e la fase di macello.

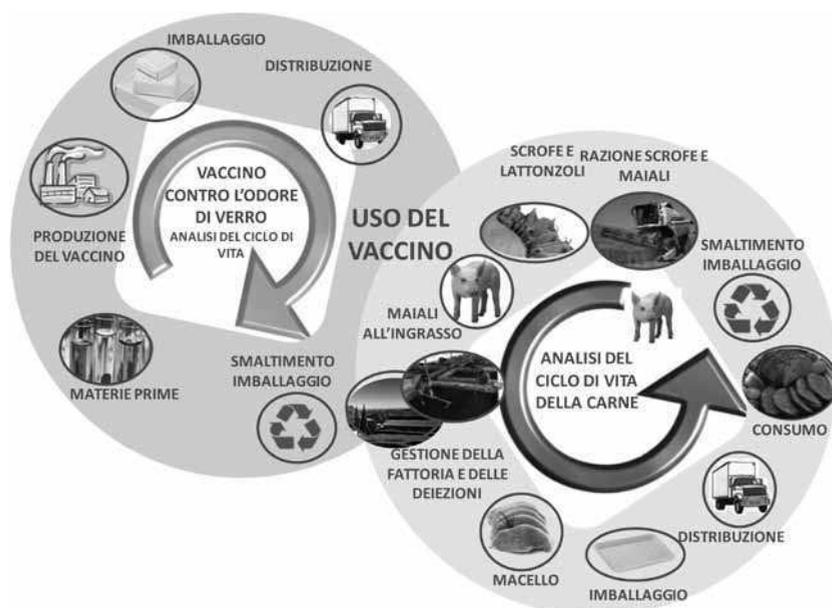


Figura 3. Schema illustrativo del sistema di produzione del prodotto immunologico e del sistema di produzione della carne di maiale. I due sistemi collegati tra di loro costituiscono il modello LCA..

Nell'analizzare la fase di allevamento sono state considerate le filiere agricole per la produzione del mangime somministrato al suino (con razione differente a seconda della fase della vita del suino stesso), il consumo di energia e materie prime presso stalla, le emissioni di ammoniaca dall'urina, le emissioni dovute alla gestione del liquame (in particolare CH₄ e N₂O) e le emissioni dovute a fermentazione enterica. Il sottosistema include anche il trasporto del suino e la fase di macellazione.

I dati utilizzati per il modello di produzione dei componenti della razione sono specifici ed i principali elementi considerati nel modello sono rappresentati da:

- resa di coltivazione;
- consumo idrico;
- produzione ed utilizzo di fertilizzanti,
- operazioni agricole e le relative emissioni.

Per le emissioni relative alla gestione delle deiezioni, sono state considerate composizioni specifiche del liquame e differenti sistemi di gestione sulla base delle informazioni fornite dalle fattorie interpellate

I risultati ottenuti in relazione ai principali indicatori di impatto analizzati sono presentati in Tabella 2 e Tabella 3; essi sono suddivisi per le fasi di upstream e core processes (approvvigionamento materie prime e produzione del vaccino) e downstream processes (fase d'uso del vaccino/allevamento dei maiali).

Tabella 2 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 CFC11 equiv.	trascurabile	trascurabile	trascurabile
Fotosmog	g C ₂ H ₄ equiv.	<0,1	<0,1	2

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

Carbon Footprint per le tre unità funzionali considerate nello studio LCA per il vaccino (dati arrotondati)				
INDICATORI D'IMPATTO		1 kg di maiale a peso vivo	1 kg di carcassa di maiale	1 kg di carne magra
Potenziale Riscaldamento Globale (GWP) [Carbon Footprint]	kg CO ₂ equiv.	5,4	7,0	12,8

L'analisi dei risultati in termini di carbon footprint ottenute dall'analisi LCA mostrano che il CF di 1 kg di suino vivo è pari a circa 5.4 kg CO₂ equivalente; l'impatto associato alla produzione del prodotto immunologico è trascurabile rispetto alle altre fasi del ciclo di vita.

Il potenziale effetto serra è dominato dalla produzione degli alimenti somministrati ai suini (36%) e dalle emissioni relative alla gestione delle deiezioni (30%), come mostrato in Figura 4.

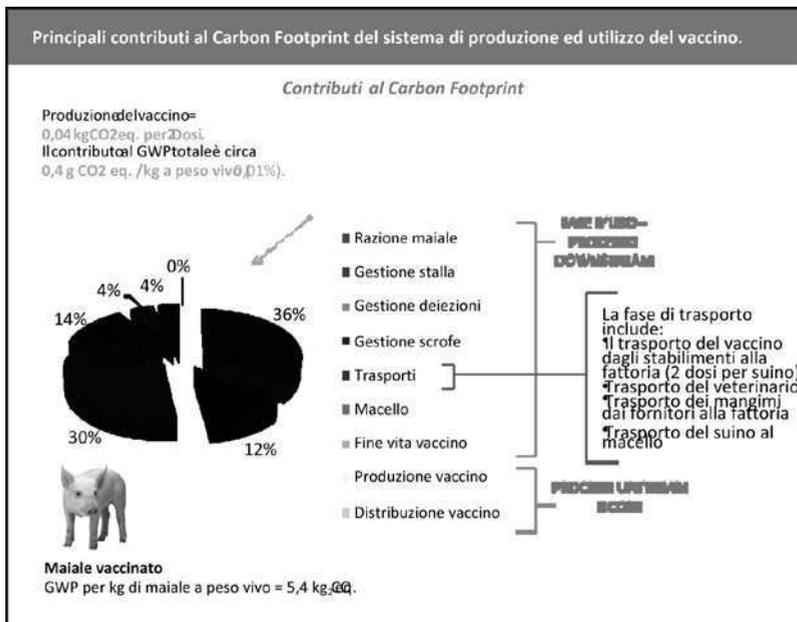


Figura 4. Principali contributi al Carbon Footprint dell'allevamento di un suino.

Prendendo come baseline i risultati ottenuti in letteratura e la Doppia Piramide Ambientale pubblicata dal Barilla Center for Food and Nutrition (BCFN), il suino si pone tra la carne bovina e carne di pollo (la differenza nel carbon footprint può essere spiegata considerando diverse efficienze di conversione del cibo e la durata del ciclo di vita), come mostrato in Figura 5.

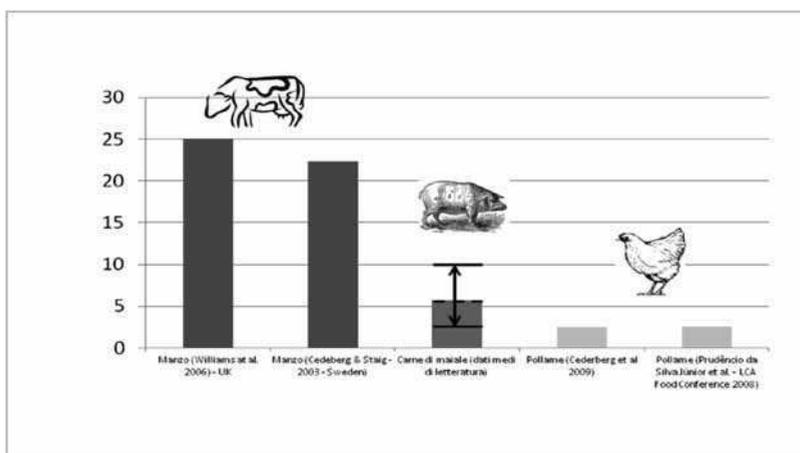


Figura 5. Carbon Footprint delle principali carni consumate in Italia da fonti di letteratura.

Dal momento che uno degli scopi di questa analisi era capire e quantificare possibili benefici ambientali legati all'utilizzo del prodotto immunologico, sono stati condotti degli studi che hanno mostrato differenze tra i suini castrati e quelli a cui è stato somministrato il prodotto immunologico, specialmente per quanto riguarda l'efficienza di conversione del cibo in massa corporea; i risultati attestano infatti un miglioramento nella conversione pari a circa 6% nel caso dei suini vaccinati.

Una migliore efficienza di conversione corrisponde ad una riduzione del consumo di mangime e conseguente produzione di liquame (ipotizzando di ottenere un peso uguale nei due suini alla fine della loro vita).

La differenza in termini di Carbon Footprint risulta pari a circa del 3.7% tra un suino castrato fisicamente e un suino vaccinato, equivalente a un risparmio di CO₂ di circa 23 kg per suino (considerando un peso medio di 110 kg); tale quantità è equivalente all'emissione di CO₂ generata da un'auto di medie dimensioni che percorre una distanza di 100 km.

SETTORE ALIMENTARE

L'ultimo settore analizzato riguarda un prodotto finito in uscita dalla filiera alimentare, ovvero il prosciutto cotto affettato pronto per il consumo.

Il sistema si basa sull'allevamento di un suino per la produzione di salumi in un contesto nazionale (170 kg), che una volta macellato viene sottoposto al processo di lavorazione e cottura presso stabilimenti dedicati. La fase di produzione, oltre al consumo di materie prime (carne di maiale sale aromi, etc) considera anche il consumo energetico e idrico dello stabilimento.

Ipotizzando di avere una linea di cottura in sacco alluminato con 20 % di perdita di peso ed una fase di affettamento, con la produzione del 15 % di scarto, i risultati ottenuti in termini di Carbon Footprint sono riportati in Figura 6.

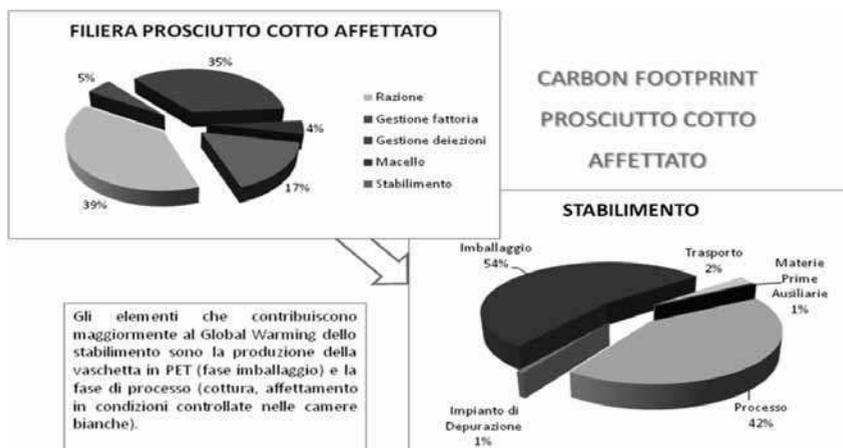


Figura 6. Principali contributi al Carbon Footprint della produzione del prosciutto cotto

Come evidenziato in figura, nell'ambito del ciclo vita del prosciutto, la fase di macello e lavorazione della carne ha un impatto pari a circa il 17% del totale, dovuto in gran parte alla cottura- raffreddamento del salume e alla fase di imballaggio; la parte preponderante dell'impatto anche in questo caso è associata alla fase di allevamento con particolare riferimento alla produzione delle razioni somministrate al suino e alla gestione delle relative deiezioni.

DISCUSSIONE

Scenari di riduzione dell'impatto

Nella fase di interpretazione e miglioramento, gli studi LCA hanno messo in luce alcuni aspetti interessanti dei tre sistemi analizzati, rendendo possibile la definizione di azioni per la riduzione dell'impatto.

Focalizzando l'attenzione alla filiera di produzione della carne suina, sono state analizzate alcune azioni di miglioramento per la riduzione del Carbon Footprint, concentrandosi principalmente sulla fase di gestione delle deiezioni e sulla produzione degli alimenti compresi nella razione somministrata al suino.

Analizzando la gestione delle deiezioni del suino, si nota come le tipologie di gestione siano davvero svariate: fosse anaerobiche, stoccaggio sotto grigliato, stoccaggio in contenitori chiusi, stoccaggio di deiezioni solide, etc.

L'analisi effettuata ha mostrato che passando da una gestione in fosse anaerobiche scoperte allo stoccaggio in contenitori sotto il grigliato, si otterrebbe una riduzione del Carbon Footprint del 14 % in relazione alle diverse emissioni di CH_4 derivanti.

Un'altra possibilità di gestione differente del liquame prevede la digestione anaerobica dello stesso; la riduzione ipotizzabile del Carbon Footprint è dell'ordine del 20%, ma richiede che il liquame in ingresso venga miscelato con letame bovino o matrici vegetali di scarto.

Spostando l'attenzione alla produzione degli alimenti, l'analisi di uno dei componenti del mangime più utilizzati, il mais, che contribuisce per circa il 50% sull'impatto della razione, mostra come si possa generare una riduzione del 2-3% sul Carbon Footprint associato alla produzione di un kg di prosciutto cotto con l'incremento della resa di coltivazione del mais del 20%.

In Figura 7 vengono riportare alcuni esempi di azioni di riduzione dell'impatto in termini di CF dovute a

- Maggiore efficienza coltivazione alimenti somministrati ai suini;
- Stoccaggio del liquame sotto grigliato
- Digestione delle deiezioni, in tratterggio, come alternativa di gestione tradizionale del liquame.

INTERVENTI DI POSSIBILE RIDUZIONE DEGLI IMPATTI

Sono possibili varie azioni di riduzione delle emissioni che permettono diverse potenzialità.

Il controllo della filiera dei mangimi e quello della gestione delle deiezioni sono certamente quelle da investire.

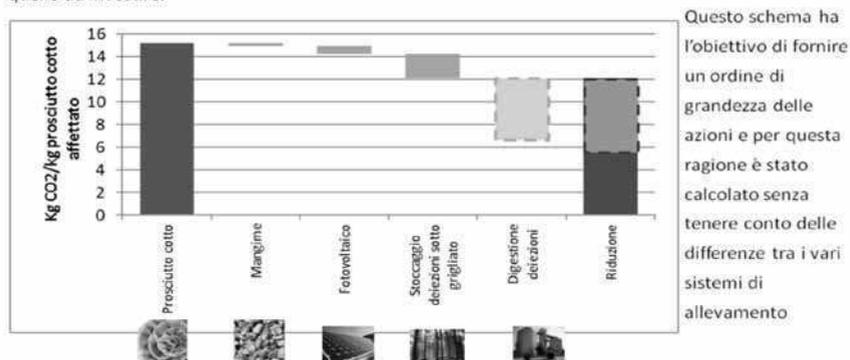


Figura 7. Principali interventi per la riduzione del Carbon Footprint applicata alla filiera prosciutto cotto

CONCLUSIONI

Il lavoro ha evidenziato il valore aggiunto dell'utilizzo della metodologia LCA (dell'Analisi del Ciclo di Vita) in termini di analisi degli scenari di riduzione dell'impatto ambientale di prodotti diversi appartenenti al settore agroalimentare. Lo studio dimostra inoltre la versatilità e la grande opportunità della metodologia LCA, applicabile anche in questo settore.

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 Institute for food and biotechnology SIK-rapport Nr 723.
- Dunshen F., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Lopatnicki 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.
- Nemecek 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” Switzerland, 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.

Cederberg, C., M. Stadig, (2003) System Expansion and Allocation in Life Cycle Assessment of Milk and Beef Production, *International Journal of LCA* **8** (6) pp. 350 -356.

Cederberg, C., U. Sonesson, J. Davis, V. Sund, (2009) Greenhouse gas emissions from production of meat, milk and eggs in Sweden 1990 and 2005, SIK-Rapport 793, SIK – Institutet för Livsmedel och Bioteknik, Göteborg, ISBN 978-91-7290-284-8.

Prudêncio da Silva Jr., V., S.R. Soraes, and R.A.F. de Alvaregna, (2008) Cradle to gate study of two differing Brazilian poultry production System, Proceedings of the 6th international conference on LCA in the agri.food sector, Zurich, Switzerland.

Williams, A.G., E. Audsley, D. L. Sanders, (2006) Determining the environmental burdens and resource use in the production of agricultural and horticultural commodities, Main Report, DEFRA Research project IS0205, Bedford: Cranfield University and Defra, available at www.silsoe.cranfield.ac.uk.

Barilla (2011) “Environmental Product Declaration of Dry semolina pasta from durum wheat (N° S-P-00217)”. The EPD International System, www.environdec.com.

Barilla Center for Food and Nutrition (2012) Doppia Piramide 2012: favorire scelte alimentari consapevoli, Parma, Italy.

DIGESTIONE ANAEROBICA E SETTORE ZOOTECNICO

ANDREA SCHIEVANO, GIULIANA D'IMPORZANO, FABRIZIO ADANI

GRUPPO RICICLA

<http://users.unimi.it/ricicla/>

DISAA - Università degli Studi di Milano, Lab. Agricoltura e Ambiente,

Via Celoria 2, 20133 Milano. Tel: 3471069800 - 0250316545

Laboratorio Biomasse e Agroenergia, Parco Tecnologico Padano - Via Einstein

Località Cascina Codazza 26900 - Lodi - tel: 0371 4662 669

La digestione anaerobica (DA) è ormai una realtà nel nostro paese ed in particolare in Lombardia. Si stima che entro l'anno 2012 siano operativi oltre 700 impianti di biogas, sul territorio nazionale.

Le politiche di incentivazione (tariffa onnicomprensiva di 0,28 €/cent/kWh) hanno sicuramente favorito la diffusione della digestione anaerobica, soprattutto in ambito agricolo. In via preliminare va rilevato che la DA ha contribuito a diversificare e sostenere il reddito agricolo in un momento particolare (periodo 2007/2010) assai critico per i diversi comparti (crisi dei prezzi dei cereali, del latte e della carne, con un lungo e prolungato momento di grave difficoltà soprattutto per il mercato dei suini). Tali situazioni, chiaramente antecedenti alla progressiva costruzione di impianti di biogas, non risultano evidentemente imputabili a queste realizzazioni (Adani et al., 2012).

Al contrario, per espresso e pressoché unanime riconoscimento degli imprenditori agricoli che hanno intrapreso tale scelta, la DA ha in realtà contribuito, in tali difficili periodi, a garantire l'esistenza in vita delle stesse aziende, coprendo le diffuse perdite negli altri comparti produttivi e assicurandole nelle prospettive future, sia sotto il profilo economico che per i richiesti e non più eludibili adempimenti di sostenibilità ambientale, in particolare per le attività zootecniche (Adani et al., 2012).

E proprio la progressiva e migliore conoscenza dei diversi vantaggi derivanti dal processo di digestione anaerobica, sia per l'impresa agricola che per valori di pubblico e generale interesse quali la qualità dell'ambiente e della vita, costituisce il patrimonio più bello e importante di questa crescita. Come in tutti i percorsi evolutivi e in particolare nelle fasi "giovanili", l'apprendimento consente di modificare e adattare gli aspetti che nel tempo perdono via via la loro attualità nel mutato contesto, ovvero si rivelano non più ottimali.

Ecco quindi che nella fase finale del periodo di durata della vigente tariffa onnicomprensiva (2008/2011, poi prorogato al 2012), favorito dal miglioramento tecnologico e da una riconosciuta affidabilità del processo di DA, si è assistito a un fenomeno di più intenso proliferare di impianti (Adani et al., 2012).

Il problema dell'impatto della filiera zootecnica sull'ambiente deriva, essenzialmente, dall'elevata concentrazione territoriale degli effluenti che, dato il loro elevato contenuto di acqua, non risultano essere economicamente trasportabili in zone a minor concentrazione di attività zootecniche. Conseguenza di ciò è che un territorio circoscritto come la Pianura Padana, non è più in grado di assorbire in modo naturale e congruente con l'ambiente i reflui prodotti e gli impatti che essi determinano (Schievano et al., 2011). Tutto ciò è noto da tempo sia a livello nazionale sia europeo, ed ha portato il legislatore a porvi rimedio limitando l'uso dei reflui zootecnici in agricoltura (EC 91/676/Cee, Direttiva nitrati). Il recepimento della

Direttiva nitrati col Dlgs. n. 152/99 e il Dm. 7/3/2006, di fatto, rende non più procrastinabile un approccio all'uso dei reflui zootecnici in agricoltura che sia virtuoso e rispettoso dell'ambiente secondo una logica di riutilizzo di "potere fertilizzante", nei limiti consentiti dalla legge, e/o di rimozione degli eccessi di "reflui/azoto" nel caso in cui le quantità da smaltire eccedano le reali richieste agronomiche da parte della colture (Schievano et al., 2011). Quanto sopra riportato viene visto spesso, dall'imprenditore agricolo, come un ulteriore aggravio nella gestione dei reflui zootecnici che si riflette negativamente poi sull'attività imprenditoriale, già difficile in questi anni per la congiuntura economica mondiale non certo felice. Tuttavia, come spesso accade, la necessità di trovare soluzioni che sembrano impossibili, può divenire spinta per concepire un nuovo tipo di agricoltura, soprattutto se si è in grado di leggere cosa sta accadendo intorno a noi e se si è in grado di non perdere le "occasioni" che ci vengono date, e il contesto in cui ci si muove, in particolare: contesto ambientale globale (effetto serra); contesto mondiale di approvvigionamento energetico: esauribilità delle fonti fossili; interazione tra i due punti sopra riportati, rinuncia al nucleare e quindi conseguente sviluppo delle fonti rinnovabili; una sempre maggior predisposizione del cittadino verso le tematiche ambientali; maggior richiesta di criteri produttivi di tipo "sostenibile"; produzione di energia rinnovabile è attività agricola (Schievano et al., 2011).

Queste considerazioni sono legate fra loro e al problema reflui zootecnici, considerando che:

– i combustibili fossili contribuiscono all'effetto serra e che quindi devono essere sostituiti sempre più da

fonti rinnovabili;

– le fonti rinnovabili, con l'avanzamento tecnologico e l'ineludibile incremento del prezzo dei combustibili fossili, diverrà sempre più competitivo;

– l'agricoltura sarà chiamata a produrre energia rinnovabile;

– energia rinnovabile può ed è già prodotta a partire dai reflui zootecnici attraverso la digestione anaerobica (biogas);

– la produzione di biogas impiegando reflui zootecnici, determina modificazione del loro stato chimico-fisico e biologico che li rende utili per un loro riutilizzo agronomico oltre che più gestibili nel caso di trattamenti chimico-fisici e biologici per la rimozione dell'azoto;

– la produzione di biogas, determina un volano economico che permette di fatto di investire in tecnologie per la gestione corretta del refluo zootecnico;

– una gestione corretta del refluo, significa una forte riduzione degli impatti che esso produce, mettendo l'agricoltura tra i primi posti nella promozione di sistemi produttivi sostenibile e ambientamenti compatibili, aspetto questo che deve trovare anche un ritorno economico diretto (più propensione del consumatore verso chi produce in tal modo), e indiretti, analisi costo-benefici dovuta ai minori costi ambientali, sanitari ecc (Schievano et al., 2011).

RIFERIMENTI

Andrea Schievano, Claudio Ledda, Silvia Salati, Gabriele Boccasile, Maria Lina Sandionigi, Flavio Sommariva, Fabrizio Adani, 2011. Così si riducono i volumi e l'azoto negli effluenti di allevamento. Terra e Vita n. 29-30/2011.

Fabrizio Adani, Tommaso Guarnieri, Gabriele Boccasile, 2012. La digestione anaerobica fa bene all'ambiente. Terra e Vita n. 8/2012

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

Salsomaggiore Terme (PR), 5 Ottobre 2012

PERCHÉ LA RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI NEI SUINI NON È COSÌ IMPORTANTE PER LA SALUTE PUBBLICA?

DAVID G S BURCH

Octagon Services Ltd, Old Windsor, Berkshire, UK

Abstract

Negli ultimi anni si è assistito ad una crescente preoccupazione per la potenziale diffusione all'uomo della resistenza antibiotica associata all'uso di antibiotici negli animali e che questi possano svolgere un ruolo significativo nel determinare la resistenza nell'uomo. La stampa 'laica' ha dichiarato che fino al 70% della resistenza osservata nell'uomo potrebbe provenire dall'uso di antibiotici nel bestiame, nonostante i report ufficiali riguardanti la valutazione del rischio indichino che non c'è alcuna prova definitiva, ma solo una stima approssimativa che un 33-50% della resistenza possa nascere dal settore agricolo. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di fare una valutazione del potenziale rischio di trasmissione d'infezioni dai suini all'uomo, sia direttamente, che tramite il consumo di carne, utilizzando una base epidemiologica. Questo dato è stato poi confrontato con l'incidenza di malattie nell'uomo causate principalmente da batteri e che, solitamente, vengono trattate con antibiotici. La valutazione dei dati ha mostrato che i suini potrebbero essere responsabili di infezioni nell'uomo, in particolare nel personale che lavora direttamente a contatto con i suini. Per quanto riguarda tutte le altre persone, la cifra risulta molto inferiore, 0,0031% su una base di popolazione, che equivale a 3,1 persone su 100.000. Le infezioni umane si manifestano e vengono trattate con antibiotici in circa il 16,34% dei casi su una base di popolazione, cioè 16.340 persone/ 100.000. Pertanto i suini causano lo 0,019% dei casi umani, e se anche tutte queste infezioni fossero dovute a batteri resistenti agli antibiotici, lo 0,019% sarebbe il contributo del suino alla trasmissione della resistenza. Se la preoccupazione principale riguardasse solo l'uso di antibiotici definiti 'critici', la cifra sarebbe minore, cioè uno 0,00034%, se si considera una percentuale di resistenza del 2%. In conclusione, questa è la ragione per la quale il trasferimento della resistenza agli antibiotici alla popolazione umana dai suini può essere considerata di minore importanza rispetto all'uso diretto di antibiotici nell'uomo, ricettati dai medici od utilizzati negli ospedali.

Introduzione

Gli antibiotici sono stati ampiamente utilizzati nella produzione suina nel corso degli anni. Recentemente sono state fatte segnalazioni di focolai di *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA) clone CC398 nei suini, inizialmente nei Paesi Bassi (Voss et al, 2005) e poi nella maggior parte dell'Unione Europea (UE) (EFSA 2009, 2010). Inoltre sono aumentate sempre più le segnalazioni di batteri che producono beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL), in particolare *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (EFSA, 2011a), in associazione al crescente utilizzo di cefalosporine di 3a e 4a generazione. E' stato poi segnalato anche un aumento della resistenza ai fluorochinoloni, soprattutto nel pollame (MARAN, 2011). Di conseguenza alcuni paesi, come i Paesi Bassi, hanno deciso di ridurre del 50% il loro consumo di antibiotici nel settore veterinario entro il 2013. La Commissione europea (2011) e il Consiglio europeo (2012) hanno delineato una revisione riguardante gli antibiotici nell'Unione Europea nel corso dei prossimi 5 anni e i dati sono attesi con grande interesse.

Ad oggi, gran parte delle informazioni in materia di trasferimento della resistenza antibiotica dagli animali all'uomo è veramente speculativa ed è quindi difficile ottenere dati definitivi

sui rischi effettivi. Tuttavia, questo non ferma la stampa ‘laica’, che esprime pareri, anche quantitativi e ha indicato che le resistenze che originano dall’uso degli antibiotici negli animali arrivano al 70%. Anche l’Ufficio di valutazione dei rischi e di programmazione della ricerca in una relazione (BuRO, 2010) al governo olandese ha dichiarato: “Non ci sono prove concrete sull’importanza del trasferimento effettivo della resistenza dagli animali all’uomo, ma una stima approssimativa indica che il **33-50% della resistenza** osservata negli agenti infettivi per l’uomo, proviene dal settore agricolo.”

E’ difficile per una sola persona rispondere a queste domande, quando i governi e gli organismi europei non sembrano in grado di farlo. Tuttavia, lo scopo di questo lavoro è quello di cercare di dimostrare che l’uso di antibiotici nei suini e il trasferimento della resistenza agli antibiotici dai suini all’uomo sono veramente di scarsa importanza. Per cercare di dimostrare scientificamente questa affermazione, verrà utilizzato un approccio epidemiologico.

L’approccio epidemiologico - la catena d’infezione

Se consideriamo un batterio zoonosico, è necessario identificare l’agente infettivo da valutare; la fonte (il suino), la via di trasmissione per l’ospite (l’uomo), la sensibilità dell’ospite alla colonizzazione e all’infezione. Se, invece, il batterio è un commensale, allora deve essere determinato il tasso di colonizzazione e di trasmissione della resistenza del batterio suino alla flora batterica dell’ospite. Un ulteriore step per i batteri commensali potrebbe essere quello di valutare il significato nell’ospite per quanto riguarda la loro capacità di causare infezioni (spesso infezioni nosocomiali/ospedaliere) e se la loro resistenza influisca sulle risposte al trattamento farmacologico.

Tabella 1. La catena d’infezione e la resistenza per batteri zoonosici e commensali (Prescott et al 2005)

La catena	Infezione zoonosica	Infezione commensale
Organismo	Batteri	Batteri
Sorgente	Suino	Suino
Ospite	Uomo	Uomo
Via	Diretta, indiretta, alimento etc	Diretta, indiretta, alimento etc
Sensibilità dell’ospite	Difese naturali, età, stato immunitario	Difese naturali, età, stato immunitario
Colonizzazione	Sì	Sì
Infezione	Sì	No (Sì- nosocomiale?)
Incidenza della malattia (%)	Sì	No (Sì- nosocomiale?)
Trasferimento di resistenza	Sì	Sì
Incidenza di mortalità	Sì	No (Sì- nosocomiale?)
Incidenza di fallimento del trattamento	Sì	Sì

Infezioni batteriche umane

Nella tabella seguente è sintetizzata una serie d'infezioni batteriche umane (Tabella 2) e le potenziali associazioni con il suino (Prescott et al, 2005; Mossad, 2010; Foxman, 2002).

Tabella 2. Infezioni batteriche umane e potenziale correlazione al suino (Prescott et al, 2005; Mossad, 2010; Foxman, 2002).

Infezioni batteriche umane	Informazioni	Potenzialmente associate al suino
<i>Airborne / respiratorie</i>	39 milioni di casi di URTI/anno in USA; 75% con prescrizione di antibiotico	
Infezioni LRT (polmoniti)		
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	<100 casi in USA/anno	
<i>Legionella pneumophila</i>	1000-1400 casi/anno USA; 30,000 non diagnosticati	
<i>Bordetella pertussis</i>	5,000 casi, 10 morti/anno in USA; 500,000 morti WW	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Uomo portatore asintomatico	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Portatore asintomatico; 60-80% di polmoniti; 150-300,000 casi, 13-66,000 morti in USA	
<i>Haemophilus influenzae</i>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	WW 1 bilione di infettati, 10 milioni casi/anno, 3 milioni di morti; USA 26,000 casi, 12,000 morti/anno	
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Mortalità <1%	
<i>Chlamydia pneumoniae</i>		
Meningite		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
<i>Neisseria meningitidis</i>		
<i>Haemophilus influenzae</i>		
Streptococchi di gruppo B		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>		
<i>Nocardia asteroides</i>		
<i>Staphylococcus aureus</i>		Si
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Infezioni associate ad artropodi		
<i>Borrelia burgdorferi</i>	20,000 casi/anno USA	
<i>Yersinia pestis</i>	25 casi 15% morti USA	
Malattie da contatto diretto		

Infezioni batteriche umane	Informazioni	Potenzialmente associate al suino
<i>Bacillus anthracis</i>	<1 caso/anno USA; 20-100,000 casi WW	Sì
Infezioni da clostridi		
<i>Mycobacterium leprae</i>	4000 casi 2-300 nuovi/anno USA; 14milioni WW	
Sessualmente trasmesse	8-10 milioni/anno USA	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Molto comuni in USA	
<i>Treponema pallidum</i>		
<i>Gardnerella vaginalis</i>		
<i>Haemophilus ducreyi</i>		
<i>Chlamydia trachomatis</i>		
<i>Mycoplasma genitalium</i>		
<i>Mycoplasma hominis</i>	Ampiamente diffuso	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Ampiamente diffuse	
Infezioni del tratto urinario (UTI)	8 milioni di casi/anno USA; donne 14 volte più degli uomini; >1 milione UTI associate alla cateterizzazione in ospedale o a domicilio	
Associate agli alimenti o all'acqua		
<i>Staphylococcus aureus</i>		Sì
<i>Bacillus cereus</i>		
<i>Clostridium perfringens</i>		Sì
<i>Clostridium difficile</i>		Sì
<i>Clostridium botulinum</i>	<100 casi/anno USA	
<i>Escherichia coli</i>		Sì
<i>Vibrio cholerae</i>	<20 casi/anno, <1% morti USA; 600,000 morti/anno WW	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
<i>Shigella</i>	25-30,000 casi/anno USA; 600,000 morti/anno WW	
<i>Salmonella typhi</i>	4-500 casi/anno, <1% mortalità in USA	
<i>Salmonella spp</i>	45,000 casi riportati/anno USA; sospetti 2-3 milioni	Sì
<i>Campylobacter jejuni</i>	2 milioni di casi/anno USA	
<i>Campylobacter coli</i>	10% casi umani	Sì
<i>Yersinia enterocolitica</i>		Sì
<i>Listeria monocytogenes</i>		
Nosocomiali (ospedali)		
<i>Staphylococcus aureus</i>	LRT, ferite chirurgiche, pelle, batteriemia	Sì

Infezioni batteriche umane	Informazioni	Potenzialmente associate al suino
<i>Escherichia coli</i>	UTI, ferite chirurgiche, pelle	Sì
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	UTI, LRT, ferite chirurgiche, pelle, batteriemia	
<i>Enterococcus spp</i>	UTI, ferite chirurgiche, batteriemia	Sì
<i>Enterobacter spp</i>	UTI, LRT, ferite chirurgiche, batteriemia	
<i>Acinetobacter spp</i>	LRT	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	LRT	

Legenda: WW = diffusa in tutto il mondo; LRT = infezione del tratto respiratorio inferiore; UTI = infezione del tratto urinario

Dei 49 agenti infettivi segnalati, solo nove sono potenzialmente associati al suino (**circa il 18%**), ma possono infettare anche altre specie animali. Anche *Streptococcus suis* è potenzialmente trasmissibile all'uomo dal suino, ma di solito colpisce solo chi lavora a stretto contatto con i suini o la carne di suino.

Infezioni più rilevanti e potenzialmente associate al suino

La tabella 3 è una panoramica dell'incidenza dell'infezione e della mortalità in alcune patologie umane e potenzialmente associate al suino.

Tabella 3. Incidenza dell'infezione e della mortalità in alcune patologie umane su base di popolazione

Infezione	Incidenza (%popolazione)	Mortalità (% casi)	Associata al suino
<i>Respiratoria</i>			
<i>URTI</i>	13 pa (75% trattati = 9.75) (USA)		
<i>LRTI(polmonite)</i>	0.13 (USA)		
<i>S. pneumonia</i>	0.05-0.1 pa (USA)	8.7-22.0 (USA)	
<i>Trasmessa sessualmente</i>	2.6-3.3 pa (USA)		
<i>Infezioni del tratto urinario (UTI)</i>	2.7 (USA)		
<i>Associate ad alimenti e acqua</i>	0.76 (USA)		
<i>S. typhi</i>	0.0017 pa (USA)	<1.0 (USA)	
<i>Salmonella spp</i>	0.015 riportati; est 1.0 pa (USA)		Sì
<i>C. jejuni</i>	0.67 pa (USA)	0.005pa (USA)	
<i>C. coli</i>	0.07 pa (USA)		Sì

Legenda: popolazioni- USA 300 milioni; pa: per anno

Se le infezioni batteriche più importanti e potenzialmente associate alla trasmissione dal suino venissero ulteriormente esaminate, il loro impatto per quanto riguarda l'infezione, la trasmissione, la mortalità e la resistenza potrebbero essere ulteriormente chiarite (Tabella 4).

Tabella 4. Confronto della probabilità che gli agenti batterici elencati causino patologie o problemi di resistenza

Batterio	Colonizzazione	Infezione	Malattia	Morte	Resistenza
<i>S. aureus</i> (MRSA CC398)	Si (DK) No (UK)	Si (DK) No (UK)	Si (DK) No (UK)	? No	Si/No
<i>S. suis</i>	Si	Si	Si	Si	No (penicillina sens)
<i>B. anthracis</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	No (penicillina sens)
<i>C. perfringens</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	No (penicillina sens)
<i>C. difficile</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss? (nosocomiale)
<i>A. baumannii</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss? (nosocomiale)
<i>E. coli</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss? (nosocomiale)
<i>Salmonella</i> spp	Si	Si	Si	Si ?	Si
<i>C. coli</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?
<i>Enterococcus</i> spp	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?
<i>Y. enterocolitica</i>	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?	Poss?

Legenda: Poss? – possibile; penicillina sens – sensibile alla penicillina

Streptococcus suis*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens

Streptococcus suis è stato causa di malattia anche nell'uomo (Barlow et al, 2003) e, nel Regno Unito (UK), il 21% degli allevatori è risultato sieropositivo. Ci sono stati circa 2

casi / anno in 20 anni di monitoraggio, con isolati dal liquido cerebrospinale o dal sangue e con il **12,5%** dei casi con morte per l'infezione. La maggior parte dei casi ha presentato segni di meningite e setticemia e ha coinvolto principalmente allevatori di suini / mandriani e lavoratori in macelli e macellerie (93% dei casi con dati epidemiologici). La resistenza non è stata un problema, perché la maggior parte dei ceppi di *S. suis* erano sensibili alla penicillina. *Bacillus anthracis* è raramente rilevato nei suini in UK e potrebbe infettare l'uomo, se strettamente coinvolto in un focolaio, comunque la maggior parte degli isolati è considerato sensibile alla penicillina.

Clostridium perfringens potrebbe potenzialmente infettare l'uomo, ma non ci sono prove che questo sviluppi malattia. La resistenza, anche in questo caso, non rappresenta un problema, in quanto la maggior parte degli isolati suini sono sensibili alla penicillina.

***Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (MRSA)**

A differenza di *S. suis*, i ceppi di MRSA sono stati un grave problema per l'uomo, non solo associati ad infezioni ospedaliere, ma anche e sempre più anche a livello extra-ospedaliero. MRSA clone CC398 è stato rilevato nei suini in molti paesi dell'UE ed ora viene isolato nell'uomo, soprattutto nei paesi che hanno un'elevata vocazione per l'allevamento dei suini, come ad esempio Paesi Bassi, Germania, Spagna e Italia. Gli allevatori di suini in Germania risulterebbero altamente infettati (**83%**), ma in generale l'infezione è rimasta ristretta agli allevatori, ai loro familiari (**4,3%**) e non si è diffusa oltre nelle popolazioni a contatto monitorate, come le scuole (Cuny et al, 2009). Anche i veterinari di suini (**36%**), il loro personale di laboratorio e i lavoratori ai macelli (**14%**) hanno dimostrato di avere una maggiore incidenza d'infezione rispetto alla media nazionale (**1-2%**) in Germania (Blaha et al, 2009). In Danimarca, si è registrato un aumento dei casi di MRSA nell'uomo, se consideriamo sia quelli che si riferiscono alla colonizzazione, sia le infezioni cliniche (vedi Figura 1).

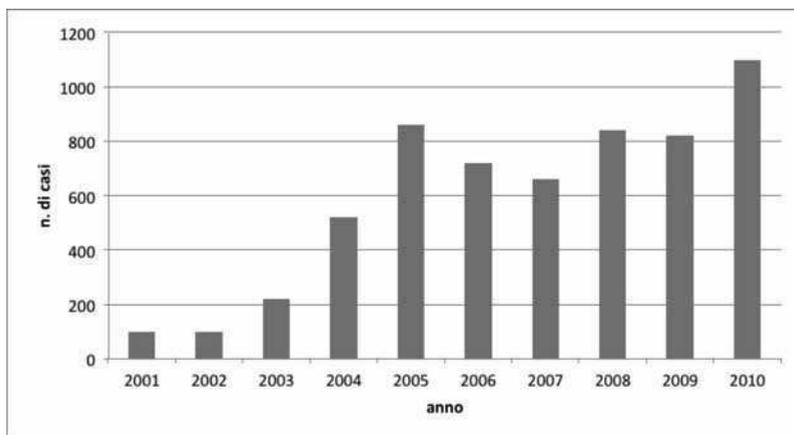


Figura 1. Numero di casi di MRSA nell'uomo in Danimarca (colonizzazione + infezione) (Danmap 2010, 2011)

Approssimativamente, il **4,95%** delle 646 infezioni cliniche umane da MRSA sono risultate associate a CC398, il clone correlato al bestiame (LA), nel 2010 (vedi Figura 2). I portatori asintomatici sono risultati maggiori, il **13,53%** dei 451 isolati (Danmap 2010, 2011).

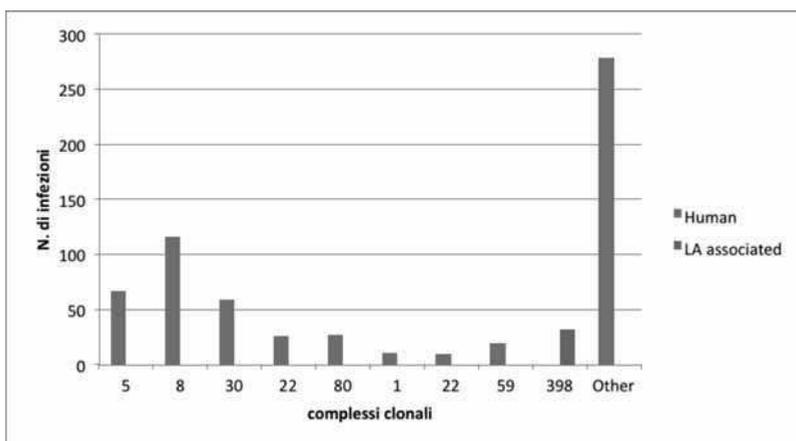


Figura 2. Complessi clonali di MRSA più comuni che causano infezioni nell'uomo in Danimarca (Danmap 2010, 2011)

Nel complesso, MRSA CC398 ha svolto un ruolo del **9,57%** in un problema in rapida crescita in Danimarca, dove i nuovi casi di MRSA (sia infetti, che solo colonizzati) sono aumentati da circa 100 nel 2001 a 1097 nel 2010 (11 volte superiore). Questo ha portato ad una sospensione volontaria dell'uso di cefalosporine di terza e quarta generazione in medicina veterinaria nel 2010 e all'attuazione di una serie di altre misure volte a ridurre l'uso di antibiotici. Su una base di popolazione (5,5 milioni), i casi di MRSA sono stati **0,02%** in Danimarca e i casi di LA-MRSA corrispondono ad un **0,002%**.

Nonostante il Regno unito sia 'free' da LA-MRSA nei suini, la Health Protection Agency (HPA) ha riportato una grave epidemia di MRSA, legata principalmente al campo medico e alle cattive pratiche igieniche ospedaliere (vedi Figura 2).

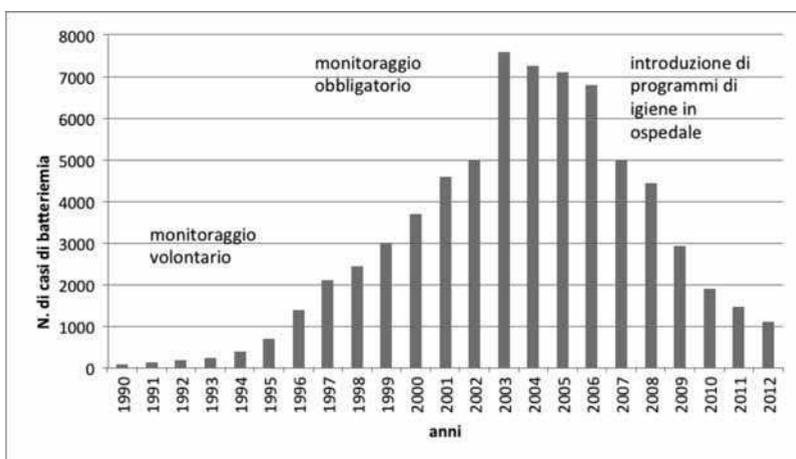


Figura 2. Epidemia di casi di batteriemia da MRSA in UK (HPA, 2006; HPA, 2012)

L'introduzione di programmi di igiene ospedaliera ha portato ad un drastico calo (-85%) di incidenza di casi di batteriemia da MRSA in UK, dallo **0,012%** fino al **0,0018%**. Questo mette in evidenza l'importanza dell'impatto nosocomiale nelle infezioni cliniche da MRSA nell'uomo, in confronto all'impatto dovuto alla trasmissione di LA-MRSA.

Focolai zoonotici e di origine alimentare (EFSA, 2011b)

EFSA (2011b) ha riportato l'incidenza di casi confermati di varie infezioni zoonosiche e di origine alimentare nell'uomo nel periodo 2005-09.

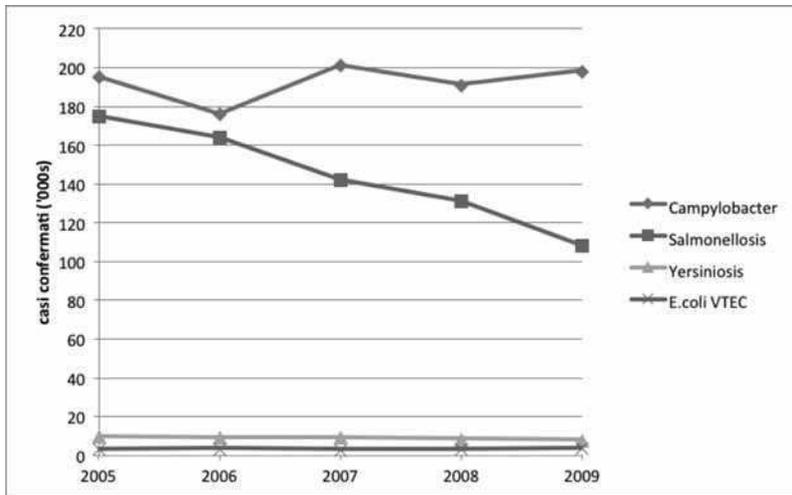


Figura 3. Incidenza di casi confermati di infezioni zoonosiche e di origine alimentare negli uomini nel periodo 2005-09 (EFSA, 2011b)

Le infezioni da *Campylobacter* sono rimaste abbastanza stabili nel corso dei 5 anni, ma vi è stata una costante diminuzione dei casi di *Salmonella*. I casi di *Yersinia* spp e di *E. coli* VTEC sono stati relativamente bassi in confronto, e quindi non saranno ulteriormente trattati.

Infezioni da *Campylobacter* spp

In un lavoro di Burch (2002) è stata rivalutata la probabile trasmissione di *C. coli* dai suini all'uomo. La maggior parte degli isolati nell'uomo era *C. jejuni* (92%) e *C. coli* (8%). Questo dato era in contrasto con i dati ottenuti nei suini (Tabella 5).

Tabella 5. Incidenza d'isolamento (%) di *Campylobacter* spp nell'uomo e negli animali (Burch, 2002)

Specie	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)
Uomo	92	8
Pollo	90	10
Bovino	99	1
Suino	4	96

In generale, si è ipotizzato che i polli / la carne di pollo potessero essere la principale via di trasmissione di *C. jejuni* per l'uomo, vista l'elevata incidenza di contaminazione delle carcasse, nonostante i suini fossero ancora considerati la principale fonte di *C. coli*. EFSA (2011a) ha mostrato che il 31% delle carcasse di pollo e della carne di pollo è risultato contaminato da *Campylobacter* spp, mentre della carne suina solo lo 0,6%. Inoltre, le correlazioni delle specie nell'uomo con quelle nel suino erano in completo contrasto, mentre erano simili a quelli di pollo.

In quel momento (Burch, 2002), la tilosina era ancora ampiamente utilizzata nei suini e c'era un livello riferito relativamente elevato di resistenza all'eritromicina. Il modello di resistenza all'eritromicina è stato poi confrontato tra le diverse specie per vedere se potesse essere stimata un'associazione o valutata una trasmissione di *C. coli* agli esseri umani (Tabella 6).

Tabella 6. Confronto di resistenza all'eritromicina (macrolide) in *Campylobacter* spp da specie diverse (Burch, 2002)

Specie	<i>C. jejuni</i> (%)	<i>C. coli</i> (%)
Uomo	2	15
Pollo	4	15
Bovino	1	-
Suino	35	57

Poiché i profili di resistenza all'eritromicina di *C. Coli* nei suini erano completamente diversi da quelli nell'uomo, ma erano quasi identici a quelli nel pollo, si è ritenuto che il contributo di infezione da *C. coli* dai suini fosse probabilmente molto basso, praticamente pari a zero.

Questo presuppone che tutte le infezioni siano trasmesse con la carne. L'incidenza media di campilobatteriosi nell'uomo aumenta nei mesi estivi. Sono quindi state valutate varie cause che potrebbero aver influenzato questo dato, ad esempio l'aumento di grigliate a base di carne nei mesi estivi o anche le vacanze al mare e la frequentazione di piscine. Questo in associazione al fatto che negli Stati Uniti, le anatre selvatiche, come ad esempio le oche canadesi (52%) sono state identificate come escrettrici di *C. jejuni*, così come le anatre domestiche (40%) (Fallacra et al, 2001). Ancora sono stati considerati anche i pic-nic in aree di pascolo di bovini, così come i pic-nic in spiaggia. Dingle et al (2002) hanno dimostrato che il *C. jejuni* rilevato nelle spiagge era identico ai ceppi umani. Questo potrebbe derivare dal rilascio di acque reflue in mare?

Infezioni da *Salmonella* spp

Nel Regno Unito, negli ultimi dieci anni si sono verificati molti cambiamenti nell'incidenza delle infezioni da *Salmonella* nell'uomo (VLA, 2002, VLA, 2007; AHVLA, 2012).

Tabella 7. Principali sierotipi di *Salmonella* riscontrati nell'uomo, nel Regno Unito tra il 2001-2011

Anno	2001	2006	2011
N. di casi riportati	18036	13412 (-25.6%)	8937 (-50.4%)
Principale serovar			
Enteritidis	65.1	55.3	30.4
Typhimurium*	13.0	12.1	25.9 (*+monophasic)
Virchov	2.2	3.2	1.5
Hadar	1.5	<0.7	<1.0
Newport	1.0	1.8	2.0
Infantis	1.0	1.2	1.9
Braenderup	0.9	0.7	<1.0
Agona	0.8	<0.7	1.6
Paratyphi B var Java	0.7	<0.7	1.3
Stanley	0.6	1.2	<1.0
Altri	13.2	23.8	35.2

Il numero di casi segnalati è infatti sceso del 50,4%, una forte flessione, ed i casi di *S. Enteritidis*, in particolare, sono drasticamente calati da 11747 a 2720 (-76,8%). *Salmonella Enteritidis* è stata principalmente rilevata nei polli e nelle uova ed è notevolmente diminuita grazie all'attuazione di iniziative di EFSA e delle industrie di pollame per ridurre l'incidenza, come la vaccinazione di galline da riproduzione e il monitoraggio degli allevamenti. Nei casi considerati sono stati inclusi anche quelli non autoctoni, ma associati a viaggi all'estero. Al contrario, *S. Typhimurium*, il sierotipo maggiormente associata al suino, è aumentata in termini percentuali, mentre in termini di casi è rimasto quasi identico (2340 nel 2001 e 2315 nel 2011). Su questa base, l'incidenza delle infezioni da *Salmonella* nei casi segnalati nell'uomo nel Regno Unito è di 0,014%, per *S. enteritidis* dello 0,0043% e per *S. Typhimurium* dello 0,0037%.

Tabella 8. Confronto tra i principali sierotipi di *Salmonella* riscontrati nell'uomo e negli animali nel 2011 (AHVLA, 2012)

Uomo	Casi (%)	Suini	Casi (%)	Polli	Casi (%)	Bovini	Casi (%)
Enteritidis	30.4	Typhimurium	42.3	Montevideo	21.0	Dublin	65.0
Typhimurium*	25.9	4,5,12:i:-	22.0	Kedougou	19.3	Mbandaka	12.9
Newport	2.0	4,12,:i:-	11.0	Senftenberg	11.7	Typhimurium	7.3
Infantis	1.9	Derby	7.1	Livingstone	10.2	4,5,12:i:-	3.8
Montevideo	1.9	Bovismorbificans	3.3	Mbandaka	9.5	Montevideo	3.5
Agona	1.6	Kedougou	2.2	Ohio	7.1	Anatum	1.7
Kentucky	1.5	London	2.2	Typhimurium	2.9	Agama	0.8
Virchow	1.5	Newport	2.2	Enteritidis	2.0	Enteritidis	0.8
Paratyphi B var Java	1.3	Panama	2.2	Derby	1.5	4,12:i:-	0.6
Oranienburg	1.1			Thompson	1.2	Infantis	0.4
Altri	30.7	Altri	5.5	Altri	13.7	Altri	3.1

*Typhimurium + monophasics; Suini = 75.3% isolati; Bovini = 11.7%

È molto difficile attribuire responsabilità alle diverse specie dei sierotipi animali che contribuiscono alla incidenza di malattia nell'uomo. Inoltre l'incidenza di ceppi monofasici nell'uomo non è registrata separatamente, questo dato sarebbe molto utile per aumentare la conoscenza epidemiologica della trasmissione. I suini sono portatori di *S. Typhimurium* (75,3% degli isolati), e quindi sono da sempre considerati responsabili per la trasmissione all'uomo, nonostante anche il pollame e i bovini siano portatori.

Nel 2012, AHVLA (2012) ha ulteriormente suddiviso i sierotipi di *S. typhimurium* in fagotipi (PTs).

Tabella 9. Fagotipi (PT) di *S. Typhimurium* da uomo e differenti specie animali (AHVLA, 2012)

Uomo	PT (%)	Suini	PT (%)	Polli	PT (%)	Bovini	PT (%)
DT193	28.6	U288	37.7	DT40	16.7	DT104	32.7
DT120	14.1	DT193	22.1	DT193	16.7	DT193	19.2
DT104	7.5	DT120	14.3	UNTY	16.7	DT120	11.5
DT8	5.4	U302	7.8			U302	9.6
RDNC	4.1	UNTY	6.5			DT8	5.8
U320	2.9	DT104B	3.9			DT2	3.8
DT191a	2.4					DT12	3.8
DT104b	2.1					U289	3.8
U323	1.9					UNTY	3.8
Altri	31	Altri	7.8	Altri	50	Altri	5.8
Totale dei principali 4	55.6		36.4		16.7		69.2
<i>Stima del contributo proporzionale (%)</i>	<i>55.6</i>		<i>28.4</i>		<i>8.2</i>		<i>28.7</i>

E' ipotizzabile che i suini rappresentino solo il **28,4%** delle principali infezioni da *S. Typhimurium* nell'uomo e il 7,4% dei casi di *Salmonella* e lo **0,0011%** su base di popolazione nel 2011.

Sono stati esaminati i profili di resistenza per gli antibiotici d'importanza critica come i fluorochinoloni e le cefalosporine di 3a e 4a generazione nel Regno Unito. Non è stata rilevata resistenza di *S. Typhimurium* a cefotaxime o ceftazidime (3a generazione) o a amoxicillina / acido clavulanico, ma è stata riportata, e sorprendentemente, in 4 isolati di *S. Derby*. Non è stata riferita alcuna resistenza a ciprofloxacina o ad amikacina, ma c'era un 23% di resistenza ad apramicina / gentamicina, soprattutto nei ceppi di *Salmonella* monofasica. La resistenza agli antibiotici critici è quindi relativamente bassa nel Regno Unito e, di conseguenza, i fallimenti della terapia a causa della resistenza sono anch'essi molto bassi.

In Europa (EFSA, 2011c) è stato riportata la resistenza comparativa di isolati di *S. Typhimurium* da uomo, suini, bovini e pollame nel 2009 (vedi Figura 4).

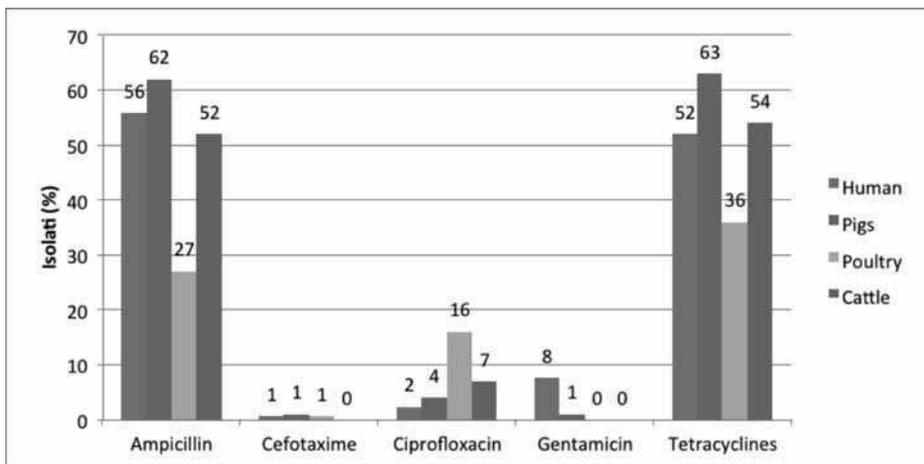


Figura 4. Profili di resistenza comparativi di vari antibiotici *S. Typhimurium* isolati da uomo, suini e pollame nell'UE (EFSA, 2011c)

Dal confronto si evince che vi è qualche variazione nei profili di resistenza tra ceppi animali e umani. Nessuno corrisponde con precisione, ma quelli di suini e bovini sono più simili di quelli del pollame, ad eccezione della gentamicina, per la quale la resistenza nei ceppi di origine umana è relativamente elevata. La resistenza agli antibiotici critici, come i fluorochinoloni (4%), per *S. Typhimurium* isolate da suino rappresenterebbe solo lo **0,000044%** della resistenza su base di popolazione e per le cefalosporine di 3a generazione (1%), ancora meno, lo **0,000011%**.

Infezioni da *Escherichia coli*

Dal punto di vista della salute pubblica, gli isolati di *E. coli* VTEC sono i più significativi, con il sierotipo O157 che corrisponde al 51,7% dei ceppi isolati nel 2009 (EFSA, 2011c). Le fonti principali sono la carne di bovini (2,3% dei campioni), il latte crudo e la carne di pecora (3,2%). La incidenza maggiore si registra in piena estate ed i bambini sono la categoria più comunemente colpita. La carne di suino non sembra essere coinvolta.

La trasmissione di *E. coli* agli allevatori di suini è stata studiata da Nijsten et al (1996) nei Paesi Bassi. I risultati ottenuti indicano che la resistenza agli antibiotici degli isolati di *E. coli* in campioni fecali di allevatori era significativamente più bassa rispetto ai campioni ottenuti da suini. Solo il 4% di *E. Coli* isolati dagli allevatori presentava modelli di resistenza identici a quelli degli isolati dai suini dello stesso allevamento. Sotto molti punti di vista questi risultati sono sorprendenti, in quanto ci si sarebbe aspettati che un'elevata esposizione diretta, per un periodo prolungato (nonostante la via di trasmissione sia quella fecale / orale), avrebbe causato un tasso maggiore di colonizzazione / contaminazione, soprattutto in confronto con l'alto tasso di colonizzazione da MRSA visto negli allevatori olandesi, attraverso la via di trasmissione nasale.

Ciò suggerisce che i ceppi di *E. coli* suini potrebbero non essere in grado di colonizzare l'intestino umano intatto e con tutti i suoi meccanismi di difesa (ad esempio l'acidità dello stomaco, la flora intestinale competitiva e ospite-adattata). Il risultato di una colonizzazione fallita non sembra nemmeno contribuire notevolmente alla resistenza antimicrobica. L'eventuale impatto sui consumatori di carne suina può essere considerato poco importante in confronto a quello sugli allevatori, ma non esiste una quantificazione di questo dato.

Tabella 10. Confronto dei profili di resistenza di *E.Coli* da suini e allevatori di suini (Nijsten et al, 1996)

Antibiotico	Resistenza nel suino (%)	Resistenza negli allevatori (%)
Amoxicillina	25	28
Amoxicillina/ac. clavulanico	0	0
Apramicina	0	0
Cloramfenicolo	13	7*
Nitrofurantoina	8	3*
Acido Nalidixico	0	2
Neomicina	7	3
Ossitetraciclina	57	32*
Streptomicina	71	35*
Sulfametosazolo	45	35*
Trimethoprim	16	10

Legenda: * = p = <0.05

Il VMD (2010) ha confrontato la sensibilità agli antibiotici di ceppi di *E. Coli* che hanno causato batteriemia in uomini con quelli isolati da suini e polli in UK.

Table 11. Confronto tra ceppi clinici di *E. coli* da uomini e suini e tra le loro resistenze (%) (VMD, 2010)

Antibiotico	Uomo (n=>10,000 isolati)	Suino (n=73-231 isolati)	Pollo (n=68-71 isolati)
Ampicillina	61	46	44
Amoxicillina/ acido clavulanico	20	1	-
Cefpodoxime (3 rd gen)	-	1	1
Ceftazidime (3 rd gen)	11	-	-
Cefotaxime (3 rd gen)	12	-	-
Enrofloxacin/ Ciprofloxacin	23	6	6
Neomicina	-	9	3
Apramicina	-	10	1
Gentamicina	9	-	-
Tetraciclina	-	78	51
Trimethoprim (sulfamidico)	40	53	24
Piperacillina/ Tazobactam	8	-	-

La prima osservazione riguarda il fatto che vi è una differenza tra i farmaci antibiotici che vengono utilizzati per uso umano o animale. Ampicillina / amoxicillina dimostrano un'elevata resistenza sia nell'uomo che negli animali, ma quando combinate con un inibitore delle beta-lattamasi, acido clavulanico, la resistenza diminuisce drasticamente negli animali ma non nell'uomo, dove sembra esserci una resistenza del 20%. Tutte le cefalosporine di 3a generazione presentano, ancora una volta, un livello molto basso di resistenza in suini e polli in confronto con gli isolati umani. Probabilmente non tutti questi isolati resistenti presentano anche geni di resistenza ESBL, che comunque sono stati rilevati nel 9,2% dei ceppi di *E. Coli* umani cefalosporina-resistenti ed anche in quelli animali, soprattutto negli isolati da bovini, ed una sola volta negli isolati da pollo. La resistenza ai fluorochinoloni è inferiore negli animali che nell'uomo. La resistenza agli aminoglicosidi è simile in uomo e suino, 9-10%, e quella al trimetoprim (+ sulfamidici) è elevata nei ceppi da uomo e suini in confronto a quelli di pollo.

Nel complesso, i dati suggeriscono che il trasferimento di *E. coli* ai consumatori di carne è relativamente basso, che anche il trasferimento di resistenza può essere considerato basso e che l'impiego di antibiotici in medicina umana ha il maggiore impatto sulla resistenza agli antibiotici nell'uomo.

Infezioni da *Enterococcus spp*

E' difficile ottenere dati precisi riguardanti la colonizzazione dell'intestino umano da parte di Enterococchi di origine animale. DANMAP 2006 (2007) offre alcuni spunti per ottenere questi dati, come il confronto dei profili di resistenza di *E. faecium* ed *E. faecalis* isolati da suini, polli da carne e tacchini e da uomini sani.

Tabella 12. Confronto dei profili di resistenza in *E. faecium* da suini sani, uomo e broiler (DANMAP, 2007)

Antibiotico	Uomo	Suini	Broiler
Tetraciclina	8	61	7
Ampicillina	4	0	0
Eritromicina	8	34	29
Gentamicina	0	0	0
Kanamicina	13	25	0
Streptomicina	4	30	14
Vancomicina	0	3	0*
Quinupristin/dalfopristin	0	1	1

Legenda: * Usando terreni selettivi resistenti alla vancomicina, *E. faecium* è stato rilevato nel 47% dei campioni di broiler, ma non in suini e bovini (DANMAP, 2011)

I profili di resistenza di *E. faecium* nell'uomo sono molto diversi da quelli che si trovano nei suini e nei broiler, con particolare riguardo a tetraciclina, ampicillina (opposto), eritromicina, kanamicina e streptomicina. Utilizzando la tetraciclina può essere trasmesso un massimo del 13%, ma purtroppo, i profili precisi per ogni isolato non sono stati confrontati.

Le differenze nei profili di resistenza di *E. faecalis* sono state meno evidenti, ma ancora una volta erano molto diversi. I singoli profili non sono stati confrontati, quindi non è stato possibile determinare una percentuale corretta.

Tabella 13. Confronto dei profili di resistenza di *E. faecalis* da suini sani, umani e broiler (DANMAP, 2007)

Antibiotici	Uomini	Suini	Broiler
Tetraciclina	39	85	27
Ampicillina	0	0	0
Eritromicina	7	38	20
Gentamicina	0	4*	0
Kanamicina	10	23	0
Streptomicina	10	32	0
Vancomicina	0	0	0

Legenda: * potenziale serbatoio / associazione con endocardite dal tipo ST16 in MLST gentamicina-resistente nell'uomo (DANMAP, 2011) o a problemi nosocomiali/ ospedalieri non determinati.

Considerando che il batterio viene trasmesso attraverso la carne di suino, che può essere consumata anche cruda in Danimarca, ma più frequentemente è cotta o affumicata, il profilo di resistenza suggerisce un basso tasso di colonizzazione e una bassa velocità di trasferimento della resistenza ad uomini sani, per un massimo del **18%** dai suini, utilizzando l'eritromicina come indicatore. I profili di resistenza dei singoli isolati non sono stati confrontati.

Altri batteri

Con altri batteri, come *C. difficile*, i tipi riscontrati negli animali (suini, bovini e polli) e nei casi clinici umani non sono mai stati confrontati direttamente, ma nel 2011 gli isolati umani sono stati selezionati per la tipizzazione basata sul ribotipo O27 mediante PCR ed anche per la resistenza alla moxifloxacin (DANMAP, 2011). Il ribotipo O78, identificato in casi nell'uomo, è stato rilevato in isolati di bovini e suini, che erano però moxifloxacin-sensibili. Gli isolati di *Acinetobacter baumannii* da infezioni nosocomiali nell'uomo non hanno mostrato alcuna derivazione da ceppi animali, utilizzando i profili PFGE (Hamouda et al, 2011).

Conclusioni

Se si valuta l'incidenza stimata di malattie causate da suini, trasmesse all'uomo, questa può essere considerata relativamente bassa e può essere calcolata come uno **0.003103%** su base di popolazione (Tabella 14).

Tabella 14. Potenziali infezioni trasmesse dal suino all'uomo

	Infezioni da batteri zoonosici			
Organismo	<i>S. suis</i>	MRSA	<i>C. coli</i>	<i>S. Typhimurium</i>
Fonte	Suino	Suino	Suino	Suino
Ospite	Allevatore/uomo	Allevatore/uomo	Uomo	Uomo
Via	Respiratoria/ferite	Respiratoria	Alimenti/carne	Alimenti/carne
Sensibilità dell'ospite	Moderate	High	High	High
Colonizzazione	Bassa, 21% negli allevatori/ Molto bassa nell'uomo in generale	Alta, >83% negli allevatori/ 9.57% casi/ Molto bassa nell'uomo in generale	No	Si 25.9% dei casi
Infezione	Molto bassa	Moderata 4.94%	No	Moderata 7.4%
Incidenza della malattia	0.000003%	0.002%	0%	0.0011%
Trasferimento di resistenza	No	No	No	Si, potenzialmente
Incidenza di mortalità	12.5%	No	No	Bassa
Incidenza di fallimento della terapia	No	No	No	Bassa
	Infezioni da batteri commensali			
Organismo	<i>E. coli</i>	Enterococchi	<i>C. difficile</i>	<i>A. baumannii</i>

Fonte	Suino	Suino	Suino	Suino
Ospite	Allevatore/uomo	uomo	Uomo	Uomo
Via	F/O; alimenti/ carne	alimenti/carne	alimenti/carne	alimenti/carne
Sensibilità dell'ospite	Bassa, 4% degli allevatori	Non definita	Non definita	Non definita
Colonizzazione	Bassa- Non definita	Non definita	Non definita	Non definita
Infezione	No (commensale)	No (commensale)	No (nosocomiale)	No (nosocomiale)
Incidenza della malattia	No (commensale)	No (commensale)	No	No
Trasferimento di resistenza	Si, potenzialmente	Si, potenzialmente	No	No
Incidenza di mortalità	No (commensale)	No (commensale)	No	No
Incidenza di fallimento della terapia	Molto bassa, non definita	Molto bassa, non definita	No	No

Key: F/O = Fecale/orale

Se l'incidenza delle malattie causate da suini viene confrontata con le infezioni nell'uomo, che possono essere trattate con antibiotici e che quindi possono potenzialmente selezionare ceppi resistenti, la percentuale dovuta all'utilizzo di antibiotici nei suini può essere considerata minima, quasi irrilevante (vedi Tabella 15).

Tabella 15. Casi relativi e trasmissione di resistenza dai suini all'uomo

Trasmissione dal suino	Trasmissione (%) su base di popolazione	Infezioni nell'uomo	Popolazione affetta e trattata (%)
<i>S. suis</i>	0.000003	Respiratorie (URTI & LRTI)	9.88
MRSA	0.002	A trasmissione sessuale	2.6-3.3 (say 3.0)
<i>Campylobacter</i> spp	0.0	Del tratto urinario	2.7
<i>S. Typhimurium</i>	0.0011	Trasmesse con gli alimenti o l'acqua	0.76
Totale	0.003103	Totale	16.34
	Trasmissione (singolo caso)		
Casi/100,000 popolazione	3.1		16,340
Caso di potenziale trasmissione dal suino all'uomo	0.019%		100%
Trasmissione della resistenza nei confronti di antibiotici critici (al 2%)	0.00034%		100%

Se l'incidenza delle malattie negli esseri umani associate con batteri provenienti da suini (**0,003103%** su base di popolazione) viene confrontata con quella di infezioni umane (**16,34%** su base di popolazione/anno), che possono essere trattate con antibiotici, la percentuale di infezioni potenzialmente causate dai suini è circa lo **0,019%** delle infezioni umane. Se tutti i batteri provenienti da infezioni di suini fossero resistenti, contribuirebbero per uno **0,019%** alla resistenza nell'uomo. Inoltre se il tasso di resistenza agli antibiotici 'criticamente importanti' è circa del **2% (0-6%)**, il contributo alla resistenza nell'uomo è verosimilmente dello **0,00034% (0,0-0,001%)**, quindi molto basso. Questo è il motivo per cui la resistenza agli antibiotici nel suino non è così importante per la salute pubblica, in confronto alle resistenze che vengono prodotte direttamente dall'uso di antibiotici in medicina umana, soprattutto a livello ospedaliero.

Bibliografia

1. AHVLA (2012) Salmonella in livestock production in GB, 2011. http://vla.defra.gov.uk/reports/rep_salm_rep11.htm
2. Barlow, A.M., Hunt, B.W., Heath, P.J. and Smith, R.M.M. (2003) The prevalence and clinical diseases caused in pigs by different serotypes of *Streptococcus suis* (June 200-September 2002) and human infection (1981 to October 2002) in England and Wales. *Pig Journal*, 51, 164-176.
3. Blaha, T., Eckmans, T., Cuny, C., Witte, W. And Meemken, D. (2009) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in veterinarians and meat inspectors. Proceedings of the 14th International Society for Animal Hygiene (ISAH) Congress, Vechta, Germany, vol 2, pp 645-648.
4. Burch, D.G.S. (2002) Risk assessment – *Campylobacter* infection transmission from pigs to man using erythromycin resistance as a marker. *Pig Journal*, 50, 53-58.
5. BuRo (2010) Bureau of Risk Assessment and Research Programming (BuRo) report – Advice on increased resistance due to concentration of AB (antibiotics) after CO (carry-over). Dated 10/12/2010.
6. Cuny, C., Nathaus, R., Strommenger, B., Altmann, D. and Witte, W. (2009) Nasal colonization of humans with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 with and without exposure to pigs. *PLoS ONE*, August: pp e6800.
7. Danmap 2006, (2007) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.
8. Danmap 2010, (2011) Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark.
9. Dingle, K.E., Colles, F.M., Ure, R., Wagenaar, J.A., Duim, B., Bolton, F.J., Fox, A.J., Wareing, D.R.A. and Maiden, M.C.J. (2002) Molecular characterization of *Campylobacter jejuni* clones: a basis for epidemiologic investigation. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 9, 949-955.
10. EC (2011) European Commission – Communication from the Commission to the European Parliament and the Council – Action plan against the rising threats from Antimicrobial Resistance.
11. European Council (2012) Council of the European Union – Council conclusions on the impact of antimicrobial resistance in the human health sector and in the veterinary sector – A “One Health” perspective.
12. EFSA (2009) Scientific report of EFSA – Analysis of the Baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part A: MRSA prevalence estimates. *EFSA Journal*, 7, 11: 1376.

13. EFSA (2010) Scientific report of EFSA – Analysis of the Baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: Factors associated with MRSA contamination of holdings. EFSA Journal, 8, 6: 1597.
14. EFSA (2011a) European Food Safety Authority, Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) – Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum beta-lactamases and/or AmpC beta-lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal, 9, 8, 2322.
15. EFSA (2011b) Scientific report of EFSA and ECDC – The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, and food-borne outbreaks in 2009. EFSA Journal, 9, 3, 2090.
16. EFSA (2011c) Scientific report of EFSA and ECDC – The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2009. EFSA Journal, 9, 7, 2154.
17. Fallacara, D.M., Monahan, C.m., Morishita, T.Y., Bremer, C.A. and Wack, R.F. (2004) Survey of parasites, and bacterial pathogens from free-living waterfowl in zoological settings. Avian Diseases, 48, 759-767.
18. Foxman, B. (2002) Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity and economic costs. American Journal of Medicine, Supplement 1A: 5S-13S.
19. Hamouda, A., Findlay, J., Hassan, L.A. and Amyes, S.G.B. (2011) Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. International Journal of Antimicrobial Agents, 38, 314-318.
20. HPA (2006) Report Health Protection Agency – *Staphylococcus aureus* bacteraemia: England, Wales and Northern Ireland, January to December 2005.
21. HPA (2012) Report Health Protection Agency – Quarterly Epidemiological Commentary: Mandatory MRSA, MSSA and *E. coli* Bacteraemia and *C. difficile* Infection Data (up to January –March 2012).
22. MARAN 2009 (2011) Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands in 2009.
23. Mossad, S.B. (2010) Upper respiratory tract infections. Cleveland Clinic, Center for Continuing Education. <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/infectious-disease/upper-respiratory-tract-infection/>
24. Nijsten, R., London, N., van den Bogaard, A. and Stobberingh, E. (1996) Antibiotic resistance among *Escherichia coli*, isolated from faecal samples of pig farmers and pigs. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 37, 1131-1140.
25. Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (2005) Chapter 37. The epidemiology of infectious disease and 39. Human diseases caused by bacteria. Microbiology, 6th Edition. Eds Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. McGraw-Hill, New York, USA.
26. VMD (2010) Veterinary Medicines Directorate Report – Overview of Antimicrobial Usage and Bacterial Resistance in Selected Human and Animal Pathogens in the UK: 2007.
27. VLA (2002) Salmonella in livestock production in GB, 2001.
28. VLA (2007) Salmonella in livestock production in GB, 2006.
29. Voss, A., Loeffen, F., Bakker, J., Klaasen, C. and Wulf, M. (2005) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. Emerging and Infectious Diseases, 11, 1965-1966.

ATTI DEL XXXIX MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA
VIROSI EMERGENTI DEL SUINO

Piacenza, 14-15 Marzo 2013

TANJA OPRIESSNIG, DVM., PH.D.

Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA. Email: tanjaopr@iastate.edu

Grazie all'avvento di metodi basati sulla PCR e all'uso sempre più frequente del sequenziamento genomico su campioni clinici, molti nuovi virus o varianti di virus conosciuti sono stati scoperti nei suini negli ultimi anni.

Questi virus possono essere suddivisi in due grandi categorie. La prima (I) comprende i *virus associati a malattia nei suini*, come ad esempio Circovirus suino tipo 2 (PCV-2), il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV), Bungowannah virus, Nipah virus, virus Menangle, virus Ebola, e altri. La seconda (II) annovera i *virus che causano infezione subclinica o per i quali non è ancora stato identificato un preciso quadro clinico fino ad oggi, a causa della mancanza di studi clinici in condizioni sperimentali controllate*. Di questa seconda categoria fanno parte Torque Teno sus virus (TTSuV), Parvovirus emergenti come i Parvovirus suini (PPV) 2-5, Bocavirus suino (PBoV) 1-5, Astrovirus suino (PAstV) 1-5, Herpesvirus linfotrofico suino (PLHV), virus dell'epatite E (HEV), Retrovirus endogeni suini (PERV), Sapovirus suino (SAV), Kobuvirus suino ed altri. E' da sottolineare che alcuni di questi sono virus zoonosici e possono infettare l'uomo, come Nipah virus, Menangle virus, Ebola virus, HEV e PERV.

Nel presente articolo verranno discussi più in dettaglio alcuni virus selezionati dai due gruppi, in particolare PCV2, Bungowannah virus, TTSuV, PAstV e Parvovirus emergenti.

Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è stato identificato nel 1998 (2) ed è oggi considerato uno dei virus economicamente più importanti nei suini. Le patologie associate a PCV2 sono riassunte nell'acronimo PCVAD (patologie Circovirus-associate) e comprendono la PMWS, patologie sistemiche o enteriche, disordini riproduttivi (aumento del numero di mummificati), o respiratorii, e, in alcuni casi, la sindrome dermatite-nefrite del suino (PDNS) (44). A livello genetico, gli isolati di PCV2 possono essere suddivisi in tre principali genogruppi: PCV2a, PCV2b, e PCV2c (48). PCV2a e PCV2b sono stati riportati in tutto il mondo. PCV2a è stato il genotipo predominante fino al 2000, anno in cui si è verificato a livello globale uno shift genetico, che ha portato alla predominanza del PCV2b (46). Ad oggi, i vaccini nei confronti del virus sono disponibili, ampiamente utilizzati ed, in genere, efficaci (5).

Bungowannah virus è stato scoperto nel 2003 durante un'epidemia di mortalità improvvisa in suinetti di 3-4 settimane di età in un allevamento nel New South Wales, Australia (37). Poco dopo le morti improvvise nei suinetti è stato osservato anche un marcato aumento di feti nati morti e mummificati. Le lesioni microscopiche negli animali colpiti erano riferibili quasi esclusivamente a miocardite multifocale non suppurativa. Vi erano inoltre tracce di insufficienza cardiaca congestizia secondaria in alcuni suinetti. Il quadro clinico è stato denominato sindrome della miocardite suina (PMC). Attraverso la tecnica della *sequence independent single primer amplification* è stato identificato un nuovo virus Pestivirus-like, denominato «virus Bungowannah» (27). L'infezione sperimentale di feti in utero è esitata nella replicazione del virus nei feti e nella trasmissione trans-uterina alla madre (18). Ad oggi, Bungowannah virus è stato identificato solo in pochi allevamenti in Australia.

Torque Teno Virus (TTV) è un piccolo virus privo di envelope, con DNA circolare a singolo

filamento, classificato nella famiglia *Anelloviridae* (19,21). È stato scoperto nel siero di un paziente umano con epatite post-trasfusionale ad eziologia sconosciuta nel 1997 (42). Da allora, le infezioni da TTV sono state descritte in primati non umani, suini, bovini, cani, gatti, galline, pecore e leoni marini. Il TTV di origine suina, Torque Teno sus virus (TTSuV), è stato descritto per la prima volta nel 1999 (32,43) e il DNA di TTSuV è stato rilevato in vari tipi di campioni di suino compresi siero, feci, saliva, sperma e vari tessuti (3,21,25,50). Ad oggi sono state identificate due specie distinte: TTSuV1 e TTSuV2, con identità nucleotidica compresa tra il 40 al 50% (14,23,40,43). I suini possono essere infettati da TTSuV1, TTSuV2, o entrambi i virus contemporaneamente. Diverse prevalenze sono state rilevate in suini sani e malati in tutto il mondo, con un tasso di prevalenza globale di TTSuV che varia notevolmente da paese a paese e anche all'interno dello stesso paese. Diversi studi indicano una probabile associazione di TTSuV1 e TTSuV2 a manifestazioni cliniche nei suini in condizioni di campo (4,26,33,41), tuttavia, la patogenicità delle due specie di TTSuV nei suini convenzionali non è stata ancora stabilita con certezza. I dati del nostro gruppo indicano una prevalenza di DNA TTSuV e IgG anti-TTSuV2 negli Stati Uniti, che sembra essere più alta nelle fasi di ingrasso e nei suini all'età di macellazione (57). Questi dati sono in contrasto con precedenti studi in Spagna che suggeriscono un elevato livello di trasmissione verticale di TTSuV (3,35,36). Suini gnotobiotici sono stati infettati con TTSuV1 e poi con PCV2 e PMWS, ed è stato osservato che probabilmente l'infezione con TTSuV1 aumenta la replicazione di PCV2 (17). Inoltre, la PDNS è stata riprodotta in suini infettati contemporaneamente anche con PCV2 e PRRSV (29). Lo stesso gruppo di ricerca ha scoperto anche che l'infezione con il solo TTSuV1 in suini gnotobiotici ha indotto cambiamenti microscopici nel tessuto polmonare (28). L'infezione sperimentale di suini convenzionali è ostacolata dalla presenza ubiquitaria di TTSuV nei suini e nel loro ambiente. Tuttavia, suini convenzionali inoculati con cloni 'tandem-dimerized' o con DNA genomico circolare di US-TTSuV2 hanno sviluppato viremia, nonostante non siano state osservate manifestazioni cliniche (22).

Astrovirus (AstV) sono virus privi di envelope, a singolo filamento di RNA a senso positivo della famiglia dei *Astroviridae* (10) e sono stati isolati dalle feci di una grande varietà di mammiferi e uccelli (6,10). Nella maggior parte delle specie, questi virus sono associati con gastroenterite negli individui giovani, tuttavia, in alcuni uccelli e animali questi virus sono stati associati anche a patologie extraintestinali (6,9,10,16). L'astrovirus del suino (PAstV) è stato riscontrato in suini nel 1980 (11), oggi sono stati identificati cinque genotipi di PAstV (31,34,47), ma l'associazione con manifestazioni cliniche di malattia rimane ancora poco chiara. Recenti indagini indicano una prevalenza del 62% analizzando campioni di feci di 269 suini con diarrea negli Stati Uniti (39). Ulteriori analisi hanno rivelato che PAstV4 è il genotipo prevalente, con il 97,5% (317/325) di positivi tra i suini infetti (56). La conoscenza del significato clinico di PAstV è ancora molto limitata. Studi pilota indicano che i PAstV sono in grado di indurre una leggera diarrea nei suinetti (24,49). In particolare, in un studio sperimentale in Repubblica Ceca, suini nati con taglio cesareo e non colostrati (cdcd) sono stati infettati con un campione di feci positivo in PCR per PAstV. I due suini infettati sperimentalmente sono stati sacrificati dopo 6-7 giorni in cui avevano sviluppato diarrea lieve. PAstV è stato rilevato nelle feci (24). In un altro studio condotto in Giappone, tre suini cdcd sono stati infettati con una sospensione di coltura cellulare contenente PoAstV e hanno sviluppato diarrea lieve (49). In entrambi gli studi, non è chiaro se fossero coinvolti altri agenti patogeni o se fossero presenti lesioni caratteristiche. Gli studi sperimentali di infezione sono principalmente ostacolati dalle difficoltà di propagazione di questi virus in vitro.

Parvovirus sono piccoli virus privi di envelope, con una struttura genomica riconducibile a

una molecola di ssDNA non segmentato di circa 4-6,3 kb (52).

Parvovirus suino 1 (PPV1) è l'unico membro della famiglia *Parvovirinae* sicuramente associato a malattia nei suini, dove provoca problemi riproduttivi, caratterizzati da infezione embrionale e fetale e morte, di solito senza segni clinici nella madre (38). Inoltre alcuni ceppi di PPV1 sono stati associati con enterite o dermatiti nei suini in accrescimento.

Nel 2001 un nuovo Parvovirus è stato scoperto casualmente nel suino durante un'indagine per la ricerca di HEV in Myanmar (20). Questo virus è stato provvisoriamente definito come Parvovirus suino 2 (PPV2), dato che era il secondo Parvovirus di origine suina del quale era stata ottenuta la sequenza completa (20). L'indagine in campioni d'archivio di sieri prelevati nel 2006-2007, ha evidenziato la presenza di questo virus in suini affetti dalla cosiddetta "high fever disease" nel sud est della Cina (54). Recentemente, nel corso di un'indagine epidemiologica per Parvovirus suini nella popolazione di suini ungherese, PPV2 è stato rilevato con una prevalenza globale del 6,4% in diversi tipi di campioni (15). Negli Stati Uniti, la prevalenza complessiva del PPV2 è risultata del 20,7% (100/483) in campioni di polmone e del 7,6% (14/185) in campioni fecali ottenuti da suini di diverse fasce di età e del 1,6% (2/122) nel siero o nei fluidi toracici ottenuti da suini neonatali (55). Recentemente, è stata descritta un'aumentata prevalenza in campioni di siero da suini con PCVAD, forse ad indicare che PPV2 è in grado di aumentare la replicazione di PCV2 (45).

Nel 2008, un nuovo Parvovirus, definito Parvovirus suino 3 (PPV3), noto anche come Hokovirus (30), Partetravirus (53), o PARV4 virus (58) è stato rilevato in campioni ottenuti da suini e bovini a Hong Kong. PPV3 è stato in seguito identificato in suini nel Regno Unito (51) e in popolazioni di cinghiali in Germania (1) e Romania (12,30). PPV3 presenta un genoma a singolo filamento di DNA di circa 5 kb, con due open reading frame ORF che codificano per proteine non strutturali e capsidi. Essi differiscono dagli altri Parvovirus in quanto presentano una VP1 relativamente grande e una unique small putative protein (30). Recentemente, un'indagine per PPV3 è stata condotta negli Stati Uniti, il DNA di PPV3 non è stato rilevato in feti (0/28) e in suinetti sottoscrofa (0/15) (58); tuttavia è stato rilevato nei suini da 10 dei 16 Stati con tassi di prevalenza crescenti all'aumentare dell'età. Specificamente, il DNA di PPV3 è stato rilevato nel 5,6% (10/178) dei suini in fase di svezzamento, nel 18,7% (44/235) di suini in accrescimento e nel 22,2% (6/27) dei suini in ingrasso (58).

Il Parvovirus suino 4 (PPV4) è stato inizialmente individuato nel 2010 negli USA in suini con diagnosi di PCVAD, e successivamente identificato anche in Cina, in Ungheria, e in Africa (8,13,51). Nel corso di un'indagine della prevalenza PPV4 in USA, il nostro gruppo ha identificato un nuovo PPV, provvisoriamente chiamato PPV5, che ha mostrato una più stretta correlazione (intesa come generale identità di sequenza del genoma del 64,1-67,3%) a PPV4 (59). L'importanza di questa scoperta è attualmente sconosciuta, anche se PPV5 sembra essere una fase intermedia tra PPV1 e PPV4.

Il primo **Bocavirus suino (PBoV)**, identificato in Svezia (7), è stato chiamato Boca-like virus suino (PBo-likeV), in quanto assomigliava ai virus appartenenti al genere Bocavirus. Questo nome deriva dalla fusione e abbreviazione di "bovine" e "canine", dato che tutti i membri noti di questo genere erano stati rilevati in bovini o cani, in quel momento. Poiché il bocavirus svedese era stato identificato nei suini e non in bovini o nei cani era stato provvisoriamente definito "Bocavirus-like" (7). Più tardi, PBo-likeV è stato rilevato anche in Cina, e rinominato quindi PBoV (60,61). Oggi sono noti cinque tipi di PBoV, tuttavia, poco si sa sulla rilevanza clinica di questo gruppo di virus per i suini.

In sintesi, le nuove tecnologie come la PCR, il sequenziamento o anche il next generation

sequencing, si tradurranno in ulteriori nuovi scoperti nei suini in modo continuativo. Le rilevanze di questi virus emergenti dovranno essere attentamente valutate, facendo opportuni studi caso-controllo e infezioni sperimentali con i singoli virus prima di trarre qualsiasi conclusione.

BIBLIOGRAFIA

1. Adlhoeh, C., M. Kaiser, H. Ellerbrok, and G. Pauli. 2010. High prevalence of porcine Hokovirus in German wild boar populations. *Virologica*. 7:171.
2. Allan, G., B. Meehan, D. Todd, S. Kennedy, F. McNeilly, J. Ellis, E. G. Clark, J. Harding, E. Espuna, A. Bøtner, and C. Charreyre. 1998. Novel porcine circoviruses from pigs with wasting disease syndromes. *Veterinary Record*. 142:467-468.
3. Aramouni, M., J. Segales, M. Cortey, and T. Kekarainen. 2010. Age-related tissue distribution of swine Torque teno sus virus 1 and 2. *Veterinary Microbiology*. 146:350-353.
4. Aramouni, M., J. Segales, M. Sibila, G. E. Martin-Valls, D. Nieto, and T. Kekarainen. 2011. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Veterinary Microbiology*. 153:377-381.
5. Beach, N. M. and X. J. Meng. 2012. Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2). *Virus Research*. 164:33-42.
6. Bidin, M., I. Lojkic, M. Tisljar, Z. Bidin, and D. Majnaric. 2012. Astroviruses associated with stunting and pre-hatching mortality in duck and goose embryos. *Avian Pathology* 41:91-97.
7. Blomström, A. L., S. Belak, C. Fossum, J. McKillen, G. Allan, P. Wallgren, and M. Berg. 2009. Detection of a novel porcine bocavirus-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Research*. 146:125-129.
8. Blomstrom, A. L., K. Stahl, C. Masembe, E. Okoth, A. R. Okurut, P. Atmnedi, S. Kemp, R. Bishop, S. Belak, and M. Berg. 2012. Viral metagenomic analysis of bushpigs (*Potamochoerus larvatus*) in Uganda identifies novel variants of Porcine parvovirus 4 and Torque teno sus virus 1 and 2. *Virologica*. 9:192.
9. Blomström, A. L., F. Widén, A. S. Hammer, S. Belák, and M. Berg. 2010. Detection of a novel astrovirus in brain tissue of mink suffering from shaking mink syndrome by use of viral metagenomics. *Journal of Clinical Microbiology*. 48:4392-4396.
10. Bosh, A., S. Guix, N. K. Krishna, E. Méndez, S. S. Monroe, M. Pantin-Jackwood, and S. Schulz-Cherry. 2011. Astroviridae, p. 953-959. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz (eds.), *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier, San Diego.
11. Bridger, J. C. 1980. Detection by electron microscopy of caliciviruses, astroviruses and rotavirus-like particles in the faeces of piglets with diarrhoea. *Veterinary Record*. 107:532-533.
12. Cadar, D., A. Csagola, M. Lorincz, K. Tombacz, M. Spinu, and T. Tuboly. 2011. Distribution and genetic diversity of porcine hokovirus in wild boars. *Archives of Virology*. 156:2233-2239.
13. Cheung, A. K., G. Wu, D. Wang, D. O. Bayles, K. M. Lager, and A. L. Vincent. 2010. Identification and molecular cloning of a novel porcine parvovirus. *Archives of Virology*. 155:801-806.
14. Cortey, M., L. Macera, J. Segales, and T. Kekarainen. 2011. Genetic variability and phylogeny of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) based on complete genomes. *Veterinary Microbiology*. 148:125-131.
15. Csagola, A., M. Lorincz, D. Cadar, K. Tombacz, I. Biksi, and T. Tuboly. 2012. Detection,

- prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Arch. Virol.* 157:1003-1010.
16. De Benedictis, P., S. Schultz-Cherry, A. Burnham, and G. Cattoli. 2011. Astrovirus infections in humans and animals - molecular biology, genetic diversity, and interspecies transmissions. *Inf. Gen. Evol.* 11:1529-1544.
 17. Ellis, J. A., G. Allan, and A. Krakowka. 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* 69:1608-1614.
 18. Finlaison, D. S., R. W. Cook, M. Srivastava, M. J. Frost, K. R. King, and P. D. Kirkland. 2010. Experimental infections of the porcine foetus with Bungowannah virus, a novel pestivirus. *Vet. Microbiol.* 144:32-40.
 19. Gallei, A., S. Pesch, W. S. Esking, C. Keller, and V. F. Ohlinger. 2010. Porcine Torque teno virus: determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Vet. Microbiol.* 143:202-212.
 20. Hijikata, M., K. Abe, K. M. Win, Y. K. Shimizu, N. Keicho, and H. Yoshikura. 2001. Identification of new parvovirus DNA sequence in swine sera from Myanmar. *Jpn. J. Infect. Dis.* 54:244-245.
 21. Huang, Y. W., B. A. Dryman, K. K. Harrall, E. M. Vaughn, M. B. Roof, and X. J. Meng. 2010. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assays for quantitation and differential detection of species- or type-specific porcine Torque teno viruses. *J. Virol. Methods* 170:140-146.
 22. Huang, Y. W., K. K. Harrall, B. A. Dryman, T. Opriessnig, E. M. Vaughn, M. B. Roof, and X. J. Meng. 2012. Serological profile of Torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and -2), and between porcine and human anelloviruses. *J. Virol.* 86:10628-10639.
 23. Huang, Y. W., Y. Y. Ni, B. A. Dryman, and X. J. Meng. 2010. Multiple infection of porcine Torque teno virus in a single pig and characterization of the full-length genomic sequences of four U.S. prototype PTTV strains: implication for genotyping of PTTV. *Virology* 396:289-297.
 24. Indik, S., L. Valicek, B. Smid, H. Dvorakova, and L. Rodak. 2006. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet. Microbiol.* 117:276-283.
 25. Kekarainen, T., S. Lopez-Soria, and J. Segales. 2007. Detection of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in boar sera and semen. *Theriogenology* 68:966-971.
 26. Kekarainen, T., M. Sibila, and J. Segales. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* 87:833-837.
 27. Kirkland, P. D., M. J. Frost, D. S. Finlaison, K. R. King, J. F. Ridpath, and X. Gu. 2007. Identification of a novel virus in pigs-Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. *Virus Res.* 129:26-34.
 28. Krakowka, S. and J. A. Ellis. 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *Am. J. Vet. Res.* 69:1623-1629.
 29. Krakowka, S., C. Hartunian, A. Hamberg, D. Shoup, M. Rings, Y. Zhang, G. Allan, and J. A. Ellis. 2008. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am. J. Vet. Res.* 69:1615-1622.
 30. Lau, S. K., P. C. Woo, H. Tse, C. T. Fu, W. K. Au, X. C. Chen, H. W. Tsoi, T. H. Tsang, J. S. Chan, D. N. Tsang, K. S. Li, C. W. Tse, T. K. Ng, O. T. Tsang, B. J. Zheng, S. Tam,

- K. H. Chan, B. Zhou, and K. Y. Yuen. 2008. Identification of novel porcine and bovine parvoviruses closely related to human parvovirus 4. *J. Gen. Virol.* 89:1840-1848.
31. Laurin, M. A., M. Dastor, and Y. L'homme. 2011. Detection and genetic characterization of a novel pig astrovirus: relationship to other astroviruses. *Arch Virol* 156:2095-2099.
 32. Leary, T. P., J. C. Erker, M. L. Chalmers, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1999. Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J. Gen. Virol.* 80:2115-2120.
 33. Lee, S. S., S. Sunyoung, H. Jung, J. Shin, and Y. S. Lyoo. 2010. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in porcine circovirus-2-negative and porcine circovirus-associated disease-affected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22:261-264.
 34. Luo, Z., S. Roi, M. Dastor, E. Gallice, M. A. Laurin, and Y. L'homme. 2011. Multiple novel and prevalent astroviruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 149:316-323.
 35. Martinez-Guino, L., T. Kekarainen, J. Maldonado, M. Aramouni, A. Llorens, and J. Segales. 2010. Torque teno sus virus (TTV) detection in aborted and slaughterhouse collected fetuses. *Theriogenology* 74:277-281.
 36. Martinez-Guino, L., T. Kekarainen, and J. Segales. 2009. Evidence of Torque teno virus (TTV) vertical transmission in swine. *Theriogenology* 71:1390-1395.
 37. McOrist, S., E. Thornton, A. Peake, R. Walker, S. Robson, D. Finlaison, P. Kirkland, R. Reece, A. Ross, K. Walker, A. Hyatt, and C. Morrissy. 2004. An infectious myocarditis syndrome affecting late-term and neonatal piglets. *Aust. Vet. J.* 82:509-511.
 38. Mengeling, W. L., T. T. Brown, P. S. Paul, and D. E. Gutekunst. 1979. Efficacy of an inactivated virus vaccine for prevention of porcine parvovirus-induced reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.* 40:204-207.
 39. Mor, S. K., Y. Chander, D. Marthaler, D. P. Patnayak, and S. M. Goyal. 2012. Detection and molecular characterization of Porcine astrovirus strains associated with swine diarrhea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 24:1064-1067.
 40. Niel, C., L. niz-Mendes, and S. Devalle. 2005. Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J. Gen. Virol.* 86:1343-1347.
 41. Nieto, D., M. Aramouni, L. Grau-Roma, J. Segales, and T. Kekarainen. 2011. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet. Microbiol.* 152:284-290.
 42. Nishizawa, T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa, and M. Mayumi. 1997. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241:92-97.
 43. Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, A. Tawara, K. Fukai, U. Muramatsu, Y. Naito, and A. Yoshikawa. 2002. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J. Gen. Virol.* 83:1291-1297.
 44. Opriessnig, T., X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2007. Porcine circovirus type 2 associated disease: Update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:591-615.
 45. Opriessnig, T., Xiao, CT, Gerber, P. F., and Halbur, P. G. 2013. Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2012.12.019.
 46. Patterson, A.R., and Opriessnig T. 2010. Epidemiology and horizontal transmission of

- porcine circovirus type 2 (PCV2). *Anim. Health Res. Rev.* 11:217-234.
47. Quan, P. L., T. A. Wagner, T. Briese, T. R. Torgerson, M. Horning, A. Tashmukhamedova, C. Firth, G. Palacios, A. Baisre-De-Leon, C. D. Paddock, S. K. Hutchison, M. Egholm, S. R. Zaki, J. E. Goldman, H. D. Ochs, and W. I. Lipkin. 2010. Astrovirus encephalitis in boy with X-linked agammaglobulinemia. *Emerg. Infect. Dis.* 16:918-925.
 48. Segalés, J., A. Olvera, L. Grau-Roma, C. Charreyre, H. Nauwynck, L. Larsen, K. Dupont, K. McCullough, J. Ellis, S. Krakowka, A. Mankertz, M. Fredholm, C. Fossum, S. Timmusk, N. Stockhofe-Zurwieden, V. Beattie, D. Armstrong, B. Grassland, P. Baekbo, and G. Allan. 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet. Rec.* 162:867-868.
 49. Shimizu, M., J. Shirai, M. Narita, and T. Yamane. 1990. Cytopathic astrovirus isolated from porcine acute gastroenteritis in an established cell line derived from porcine embryonic kidney. *J. Clin. Microbiol.* 28:201-206.
 50. Sibila, M., L. Martinez-Guino, E. Huerta, A. Llorens, M. Mora, L. Grau-Roma, T. Kekarainen, and J. Segales. 2009. Swine torque teno virus (TTV) infection and excretion dynamics in conventional pig farms. *Vet. Microbiol.* 139:213-218.
 51. Szelei, J., K. Liu, Y. Li, S. Fernandes, and P. Tijssen. 2010. Parvovirus 4-like virus in blood products. *Emerg. Infect. Dis.* 16:561-564.
 52. Tijssen, P., M. Agbandje-McKenna, J. M. Almendral, M. Bergoin, T. W. Flegel, K. Hedman, J. Kleinschmidt, Y. Li, D. J. Pintel, and P. Tattersall. 2011. Family Parvoviridae, p. 405-425. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carsten, and E. J. Lefkowitz (eds.), *Virus Taxonomy*. Academic Press, London.
 53. Tse, H., H. W. Tsoi, J. L. Teng, X. C. Chen, H. Liu, B. Zhou, B. J. Zheng, P. C. Woo, S. K. Lau, and K. Y. Yuen. 2011. Discovery and genomic characterization of a novel ovine partetravirus and a new genotype of bovine partetravirus. *PLoS One* 6:e25619.
 54. Wang, F., Y. Wei, C. Zhu, X. Huang, Y. Xu, L. Yu, and X. Yu. 2010. Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. *Virus Genes* 41:305-308.
 55. Xiao, C. T., P. F. Gerber, L. G. Gimenez-Lirola, P. G. Halbur, and T. Opriessnig. 2012. Characterization of porcine parvovirus type 2 (PPV2) which is highly prevalent in the USA. *Vet. Microbiol.* 161:325-330.
 56. Xiao, C. T., L. Gimenez-Lirola, P. Gerber, Y. H. Jiang, P. Halbur, and T. Opriessnig. 2012. Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstV) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *J. Gen. Virol.* 94:570-581.
 57. Xiao, C. T., L. Gimenez-Lirola, Y. W. Huang, X. J. Meng, P. G. Halbur, and T. Opriessnig. 2012. The prevalence of Torque teno sus virus (TTSuV) is common and increases with the age of growing pigs in the United States. *J. Virol. Methods* 183:40-44.
 58. Xiao, C. T., L. G. Gimenez-Lirola, P. G. Halbur, and T. Opriessnig. 2012. Increasing porcine PARV4 prevalence with pig age in the U.S. pig population. *Vet Microbiol.*
 59. Xiao, C. T., Halbur, P., and Opriessnig, T. 2013. Complete genome sequence of a novel porcine parvovirus (PPV) provisionally designated PPV5. *Genome Annouc.* In Press.
 60. Zeng, S., D. Wang, L. Fang, J. Ma, T. Song, R. Zhang, H. Chen, and S. Xiao. 2011. Complete coding sequences and phylogenetic analysis of porcine bocavirus. *J. Gen. Virol.* 92:784-788.
 61. Zhai, S., C. Yue, Z. Wei, J. Long, D. Ran, T. Lin, Y. Deng, L. Huang, L. Sun, H. Zheng, F. Gao, H. Zheng, S. Chen, and S. Yuan. 2010. High prevalence of a novel porcine bocavirus in weanling piglets with respiratory tract symptoms in China. *Arch. Virol.* 155:1313-1317.

VIROSI EMERGENTI DEL SUINO: LA SITUAZIONE ITALIANA

ELENA CANELLI

Reparto di Virologia, IZSLER, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna 'B. Ubertini', Brescia. E-mail elena.canelli@izsler.it

I patogeni emergenti e riemergenti rappresentano un costante rischio per la sanità animale e umana. I suini sono sempre più spesso identificati come i principali portatori di un ampio range di virus che sembrano stabilire una persistenza a lungo termine in questa specie (Lan et al., 2011), oltre a fungere da reservoir per svariati agenti zoonosici. Di conseguenza, è fondamentale la costante sorveglianza sull'emergenza di patologie o virus mai osservati in precedenza (virus/patologie emergenti), ed anche di patologie o virus già conosciuti, ma che si possono ripresentare dopo lunghi periodi di assenza o con caratteri differenti da quelli classici cambiando, ad esempio, ospite, prevalenza o distribuzione geografica (virus/patologie riemergenti).

Negli ultimi trent'anni circa, nuove virosi sono emerse nella popolazione suina di tutto il mondo. Ne sono stati un importante esempio a livello globale il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) e il circovirus suino tipo 2 (PCV-2), comparsi negli anni '90 e ancora oggi causa di notevoli perdite economiche per l'industria suinicola. In Italia, le prevalenze per entrambe le malattie sono molto alte, spesso superiori al 90% di aziende positive, ed oggi questi virus sono stabili nella popolazione suina italiana. Per questo motivo, pur considerando la loro importanza e le molteplici evoluzioni, non sono più ritenuti virus "emergenti". La stessa situazione è comune anche al coronavirus respiratorio suino (PRCoV), descritto come un mutante deleto del virus responsabile dell'enterite trasmissibile (TGEV), che, riportato per la prima volta in Italia nel 1997, ha velocemente sostituito il TGEV e presenta oggi una positività sierologica vicina al 100% (dati non pubblicati). Ciò nonostante, in alcuni paesi è stata riscontrata negli ultimi anni la ricomparsa del virus TGEV (Lorincz et al., 2011), ponendo interrogativi sull'evoluzione di questi patogeni, anche in termini di immunità.

Tra i principali virus riscontrati negli ultimi decenni nel suino non vanno dimenticati i virus influenzali che, per le loro caratteristiche intrinseche, rappresentano candidati ottimali non solo come virus emergenti, ma anche come virus potenzialmente zoonosici. Tra i più recenti, spicca per notorietà il virus influenzale pandemico H1N1 (A/pH1N1), descritto per la prima volta nel 2009 e riscontrato anche in Italia nello stesso anno. Un altro recente esempio è il virus H3N2v di origine suina, identificato in 12 casi di influenza nell'uomo in USA da luglio a dicembre 2011 e in 307 casi da gennaio a settembre 2012. Nella maggioranza dei casi è stato dimostrato il contatto prolungato con suini, nei quali il virus è stato isolato a partire dal 2010 (CDC, 2012). Si tratta di una 'variante' (H3N2v), in quanto circolava solo nel suino, ed è poi stato identificato anche nell'uomo. Le infezioni umane con virus influenzali del suino sono eventi rari, ma la loro frequenza sta aumentando negli ultimi anni, e devono quindi essere monitorate con estrema attenzione.

Inoltre è stata anche identificata una serie di altri virus, perlopiù associati ad infezioni subcliniche o con un'implicazione clinica/economica limitata o molto incerta. Fanno parte di questo gruppo: Torque Teno sus virus (TTSuV), bocavirus suino (PBoV) e altri parvovirus (hokovirus suino _PPV3 o PARV-4-likeV o PHoV e parvovirus suino 4 _PPV4), kobuvirus suino, torovirus suino (PToV), astrovirus suino (PAstV). Si aggiungono poi anche quei virus che rappresentano un potenziale problema per la salute pubblica, se si tiene conto del rischio

zoonosico (come nel caso del virus dell'epatite E del suino (HEV suino)), potenzialmente zoonosico (calicivirus enterici quali sapovirus (SaV) e norovirus (NoV), PPV4 e TTSuV) e xenozoonosico (retrovirus endogeni suini (PERV), herpesvirus linfotropico del suino, PLHV). Infine, pur non essendo mai stati segnalati in Italia, fanno parte di questo elenco virus sporadicamente riportati o strettamente limitati ad alcune aree geografiche: Nipah virus (NiV), Menangle virus (MenPV), rubulavirus suino (PoRV), responsabile di Blue Eye Disease (BED) in Messico, Bungowannah virus associato a miocardite del suino (PMS) in Australia.

Tra i virus ri-emergenti o a potenziale ri-emergenza sono annoverati i virus delle pesti suine (virus della peste suina africana _ASFV e virus della peste suina classica _CSFV), e, come già accennato, il Coronavirus della TGE. L'attenzione nei confronti di questi virus deve essere elevata, poiché l'individuazione precoce della circolazione virale può impedirne un'ampia diffusione sul territorio.

Come per le altre produzioni zootecniche, anche per l'allevamento suino italiano gli ultimi decenni coincidono con una serie di evoluzioni quali l'aumento delle dimensioni degli allevamenti e delle performance, il mutato management del periodo di svezzamento (svezzamento precoce, *cross fostering* ecc.), l'aumentato utilizzo di vaccini e antibiotici per contrastare importanti forme cliniche, e la globalizzazione del mercato. In generale, l'associazione di fattori manageriali, ambientali e alimentari può aver influito sul progressivo aumento dell'incidenza e in alcuni casi dell'importanza di questi virus, spesso caratterizzate da andamento endemico, scarsa risposta immunitaria, segni clinici assenti o variabili e multifattorialità. Da non dimenticare poi l'evoluzione delle metodiche diagnostiche, che permettono una sempre maggiore e precisa individuazione dei virus circolanti.

Segue un breve riassunto della situazione italiana relativa ad alcuni tra i principali patogeni emergenti del suino.

VIRUS EMERGENTI

Torque teno sus virus (TTSuV)

I Torque Teno sus virus (TTSuV: TTSuV1 e TTSuV2 o TTSuVk2a) fanno parte della famiglia *Anelloviridae* e infettano suini e cinghiali. Recentemente è stata descritta un'ulteriore specie definita TTSuVk2b (Cornelissen-Keijsers et al., 2012). Anche in Italia, come nel resto del mondo, l'interesse nei loro confronti è aumentato negli ultimi anni, in quanto svariati studi ne hanno ipotizzato il coinvolgimento nella patogenesi di malattie quali ad esempio la PMWS. Nonostante il recente interesse, tali virus circolavano già da tempo nella popolazione suina senza essere rilevati.

Dato questo che viene confermato da uno studio retrospettivo (Bresaola et al., 2010) che ha valutato la prevalenza di TTSuV suini in associazione a PCV-2 in 95 sieri di suini italiani prelevati dal 1990 al 2009. Il 76,84% dei campioni è risultato positivo per almeno uno dei due TTSuV: 56,84% positivi almeno per TTSuV1; 48,42% positivi almeno per TTSuV2; 28,42% positivi contemporaneamente per entrambe le specie) e il 43,16% dei campioni era positivo per PCV-2. In particolare 38 sieri (40%) sono risultati positivi sia per TTSuV, che per PCV-2. Il 21,05% era co-infetto da TTSuV-1 e PCV-2 e il 28,42% da TTSuV2 e PCV-2, indicando un'associazione statisticamente significativa per la presenza di entrambe le infezioni nei suini italiani a partire dal 1990. In un'ulteriore studio (Martelli F. et al., 2006), sono stati analizzati 179 sieri di suini sani provenienti da 10 allevamenti del centro-nord Italia per la presenza di TTSuV. Il 24,0% è risultato positivo, con una prevalenza maggiore negli ingrassi (40%) rispetto agli allevamenti a ciclo chiuso (11%), indipendentemente dalle dimensioni dell'allevamento. All'interno degli ingrassi gli animali in svezzamento presentavano un prevalenza maggiore (57%).

Non esistono altri dati riguardo la sieroprevalenza nel resto del paese. In generale, dai dati ottenuti a livello internazionale, sembra più credibile che la replicazione dei TTsuVs sia favorita durante varie condizioni patologiche o immunosoppressive, piuttosto che essi stessi abbiano un ruolo primario nella patogenesi.

Nuovi parvovirus del suino (porcine bocavirus (PBoV)_ porcine hokovirus-PHoV e porcine parvovirus 4_PPV4)

I parvovirus sono patogeni molto diffusi e responsabili di varie patologie negli animali e nell'uomo. Fanno parte di questa famiglia alcuni virus emergenti del suino, quali bocavirus suino (PBoV), hokovirus suino (PPV3 o PARV-4-likeV o PHoV) e parvovirus suino 4 (PPV4). In Italia non sono ancora stati riportati rilevamenti di PHoV e PPV4; in uno studio recente (Canelli et al., 2012a) è invece stata valutata la presenza di PBoV in allevamenti suini del Nord Italia, mediante l'analisi in real time PCR di 444 campioni (feti, visceri, tamponi nasali e bronchiali) di suini di varie classi d'età. Il 16,4% dei campioni analizzati e il 22% degli allevamenti sono risultati positivi. L'indagine condotta ha indicato che PBoV circola negli allevamenti suini del Nord Italia e che i suini in svezzamento sono quelli maggiormente sensibili all'infezione, pur non chiarendo definitivamente il ruolo di questo virus nella patogenesi di malattia.

Porcine kobuvirus

Kobuvirus suino è un virus appartenente alla famiglia *Picornaviridae*, che comprende anche Aichi virus e kobuvirus bovino, è endemico negli allevamenti suini in tutto il mondo (Reuter et al., 2011).

Gli unici riferimenti italiani alla presenza di Kobuvirus nei suini sono alcune sequenze (n. KC204941 a KC204950) depositate in Gen Bank dallo stesso gruppo che ha pubblicato anche il primo rilevamento in Italia del Kobuvirus bovino (Di Martino et al., 2012a). Ad oggi non esistono comunque riferimenti bibliografici o dati sulla prevalenza o sull'impatto del virus nel nostro paese.

Porcine torovirus (PToV)

I torovirus sono virus appartenenti alla famiglia *Coronaviridae* e causano patologie enteriche e diarrea anche nel suino.

Nel 1990 Lavazza e Perini hanno osservato particelle toro virus-like al microscopio elettronico in feci di suinetti con diarrea (Lavazza e Perini, 1990). In seguito l'analisi genetica di altre particelle individuate al microscopio elettronico ne ha confermato l'identità con torovirus suino (PToV-BRES) (Pigantelli et al., 2009). Nel 2002 e nel 2004 sono stati poi rilevati utilizzando la microscopia elettronica altre particelle riferibili a torovirus, sempre in campioni di suini con diarrea e sempre in associazioni ad altri virus enterici (es. rotavirus) (Lavazza et al., 2008).

I dati presentati finora sembrano coinvolgere in modo sporadico il PToV a casi enterite post-svezzamento. Non esistono altre segnalazioni di questo virus in Italia, né dati sulla prevalenza d'infezione negli allevamenti.

Swine hepatitis E virus (swine HEV)

Il virus dell'epatite E (HEV), appartenente al genere *Hepevirus*, è stato segnalato nel suino nel 1997 e ad oggi risulta diffuso a livello mondiale sia nella popolazione suina domestica che in quella selvatica, ma anche in altre specie. La malattia è considerata una zoonosi emergente e il quadro italiano rispetto questa infezione è abbastanza completo.

Il virus è stato rilevato per la prima volta in allevamenti suini italiani nel 2005 mediante RT-PCR (Caprioli et al., 2005). In seguito, è stata riportata una positività del 45% (Di Bartolo et al., 2008) analizzando in RT-PCR campioni da 274 suini e 6 aziende, con una prevalenza più elevata nei magroni (42,2%) nel settore ingrasso e del 43,1% nelle scrofette, del 38,6% nelle scrofe giovani, e del 53,4% nelle scrofe anziane, per quanto riguarda il settore riproduzione. In Piemonte, una ricerca condotta nel 2010 (Dell'amico et al., 2010) ha identificato il virus nelle feci di suini tra 2, 5 e 5 mesi d'età. Di Bartolo et al., 2009a descrivono un 47% di campioni positivi virologici al macello (feci e/o bile). Martinelli et al., 2009 hanno inoltre condotto uno studio sierologico, rilevando una prevalenza del 50,2 %, con il 97,4 % degli allevamenti analizzati positivi. Ancora, Angeloni et al., 2011 hanno descritto una prevalenza virologica del 27% in allevamenti da ingrasso in suini tra i 100 e i 300 giorni d'età, con una maggiore prevalenza negli animali di circa 140 giorni. Nel Sud Italia un lavoro di Maione e collaboratori, 2011, che ha analizzato animali tra 2 e 8 mesi d'età, ha mostrato una prevalenza del 79,2% per i campioni fecali, del 30% per i campioni di fegato e la ricerca di anticorpi per HEV, ha dato una positività del 69,2%. In Sardegna (Ponterio et al., 2011) rileva una prevalenza anticorpale del 97% in sieri di suini in fase di macellazione. Per tutti gli studi il genotipo identificato è sempre il 3.

L'elevata prevalenza d'infezione e l'elevata sieroprevalenza riscontrate nei diversi studi confermano che l'infezione da virus dell'epatite E è estremamente diffusa in Italia (sia in termini di d'aziende infette, sia individuale) e, probabilmente, endemica e che il virus sta circolando attivamente in numerosi allevamenti. All'interno degli allevamenti esaminati, la presenza di HEV è stata riscontrata in animali di tutte le categorie produttive.

Porcine sapovirus (porcine SaV), porcine norovirus (porcine NoV) e altri calicivirus enterici

Norovirus (NoV) e sapovirus (SaV) appartengono alla famiglia *Caliciviridae* e sono virus emergenti del suino, che ne rappresenta un potenziale serbatoio di infezione per l'uomo.

In uno studio condotto nel 2007 (Martella et al., 2008a), 209 campioni di feci di suinetti con diarrea provenienti da 118 allevamenti italiani sono stati analizzati per calicivirus enterici del suino. Il 32,5 % dei suini e il 38,9 % delle aziende è risultato positivo. I calicivirus erano presenti o soli o in infezioni miste, soprattutto con rotavirus di gruppo A e C. La maggior parte dei calicivirus identificati apparteneva al genogruppo GGIII dei SaV, per alcuni non è stata possibile alcuna identificazione, mentre non sono stati rilevati NoV. La prevalenza è risultata maggiore in suini di 3-4 mesi d'età. Alcuni dei sapovirus identificati erano geneticamente correlati a SaV umani (Martella et al., 2008b), anche se uno studio di Reuter et al., 2010 non ha rilevato SaV zoonosici tra quelli europei, compresi quelli italiani. Nel 2009 Di Bartolo e coll., hanno analizzato circa 200 campioni fecali prelevati da altrettanti suini sani provenienti da 23 allevamenti localizzati nella regione Emilia-Romagna (Di Bartolo et al., 2009b). La prevalenza di positivi è stata del 13% (tra NoV e SaV). Nonostante la prevalenza maggiore per SaV, sono stati rilevati anche NoV. In generale l'identificazione di questi ultimi è sporadica (Martella et al., 2008a) e solitamente in animali adulti (Wang et al. 2007).

Qualche anno fa un nuovo gruppo di calicivirus suino, definito St-Valerian-like è **stato identificato in Canada** (L'Homme et al., 2009). In Italia è stato riportato in seguito all'analisi di 264 campioni fecali di suini sani adulti (Di Martino et al., 2011). Cinque suini di 24-36 settimane d'età sono risultati positivi per questo calicivirus, confermando i dati per cui il virus sembra essere correlato solo a suini in fase di ingrasso. Un recente studio ne ha anche analizzato la sieroprevalenza in Italia, rilevando una positività del 10,3% su 614 sieri analizzati (Di Martino et al., 2012b) e indicando che l'infezione è comune negli allevamenti italiani.

Gli studi condotti dimostrano la circolazione di calicivirus enterici nei suini italiani, in particolare di sapovirus, non chiariscono tuttavia la correlazione eziopatogenetica ad enterite nel suino né il potenziale ruolo di serbatoio per i calicivirus umani.

Astrovirus suino (PAstV)

Gli astrovirus (AstV) sono piccoli virus privi di envelope a singolo filamento di RNA rilevati in diverse specie in associazione a enterite. L'astrovirus suino (porcine astrovirus, pAstV) è stato descritto per la prima volta utilizzando la microscopia elettronica (ME) in feci di suinetti diarroici (Bridger, 1980). PAstV è stato poi riportato in associazione a gastroenterite (Indik et al., 2006), ciononostante Luo et al., 2011 ne hanno rilevato la presenza anche in suini sani. I dati riguardanti la distribuzione, l'epidemiologia e la significatività degli astrovirus nel suino sono ancora limitati.

In Italia è stata condotta un'indagine (Canelli et al., 2012b) mediante RT-PCR per la presenza di pAstV in campioni di suini con enterite o diarrea, per i quali la diagnosi in microscopia elettronica era di presenza di particelle enterovirus-like (EVL). Il virus è stato rilevato sia solo, che in associazione ad altri patogeni enterici. I risultati ottenuti hanno indicato 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.

Nuove indagini (dati non pubblicati) confermano l'elevata prevalenza di pAstV in feci di suini con enterite o diarrea, inoltre è in corso uno studio longitudinale per valutare le dinamiche di infezione in allevamenti di campo e l'analisi di suini sani e senza sintomatologia enterica per completare il quadro epidemiologico.

Swine Influenza Pandemic H1N1 (A/pH1N1)

Il virus dell'influenza suina (SIV) tipo H1N1 è stato descritto per la prima volta in Italia nel 1976. Questo virus, definito 'classico' e diffuso in tutta Europa, è stato poi sostituito con un virus di origine aviaria che ha circolato dagli anni '80 in poi. Nel 2009 un nuovo virus H1N1 pandemico è stato descritto in Messico e isolato anche in Italia (Moreno et al., 2010), in un allevamento che presentava diminuite performance riproduttive nelle scrofe, con febbre, depressione, anoressia, agalassia e nei suinetti diarrea e perdita di peso. La morbilità è stata di circa 30% nelle scrofe e la mortalità totale inferiore al 10%. Anche in Sicilia è stato descritto un focolaio di H1N1 pandemico in un allevamento con sintomatologia respiratoria (Guercio et al., 2012).

Il continuo monitoraggio sui ceppi circolanti operato dall'IZSLER sulla stessa area geografica fino al 2009 ha dimostrato che questo particolare virus pH1N1 non era mai circolato prima nella popolazione suinicola italiana. Dal 2009, inoltre, tutti i ceppi influenzali di suino che vengono identificati presso l'IZSLER vengono tipizzati per valutare la presenza del virus pandemico. Fino ad oggi l'incidenza è stata quasi nulla, con il rilevamento di pochi casi sporadici (dati non pubblicati).

VIRUS RIEMERGENTI o potenzialmente ri-emergenti

Coronavirus della TGE

La gastroenterite trasmissibile del suino (TGE) è una patologia enterica causata da coronavirus del suino. Nei suinetti senza immunità materna l'infezione nella prima settimana di vita può avere un effetto devastante con vomito, diarrea e mortalità prossima al 100%. Durante la metà degli anni '80 un mutante debole di questo virus definito coronavirus respiratorio del suino (PRCoV) a patogenicità lieve o limitata è emerso in tutto il mondo andandosi a sostituire al TGEV, grazie all'immunità cross-protettiva indotta dal nuovo virus.

Recentemente però non solo vengono descritte sieropositività sporadiche (Brendtsson et al., 2006), che indicano una circolazione ad un livello probabilmente inferiore a quello necessario per le manifestazioni cliniche, ma anche, e sempre più spesso, casi di diarrea nei suinetti, associati alla rilevazione di TGEV, da solo o in associazione a PRCoV in allevamenti con condizioni immunitarie scarse o diminuite dalla circolazione di patogeni immunosoppressori (Lorincz et al., 2011).

Virus della Peste Suina Africana (ASFV)

African Swine Fever Virus (ASFV) è l'agente causale della Peste Suina Africana (ASF). Negli anni '70-'80 il virus della ASF è circolato in tutto il mondo e in seguito a notevoli sforzi è stato eradicato, con l'eccezione della Sardegna e del continente africano, soprattutto nelle zone del sud-est. A partire dagli anni '90 il virus ha cambiato epidemiologia e distribuzione, spostandosi in territori non solitamente colpiti dall'infezione, come l'Africa dell'ovest e reintroducendosi anche in Europa (Sanchez-Vizcaino et al., 2011). L'aumento della circolazione virale in Africa, insieme all'aumentata movimentazione di prodotti e animali e ai casi riportati nella regione caucasica (Armenia, Georgia e Azerbaijan) e in vari paesi della Russia, rappresentano un rischio grandissimo di introduzione in Europa ed anche in Italia nelle zone ad alta densità di allevamenti suini, soprattutto se si tiene della vicinanza dell'Unione Europea (UE) alle zone infette, della mancanza di reali punti di controllo frontalieri in tutta la Federazione Russa (*custom agreement*), dell'endemizzazione dell'infezione in questi territori e del coinvolgimento, seppur limitato, sia dei cinghiali sia delle zecche nell'epidemiologia della malattia. A questo si aggiunge che la movimentazione di animali e mangimi a volte avviene in modo illegale e il fatto che non esistono vaccini e che l'unico metodo di controllo è la diagnosi precoce di malattia e il severo controllo dei prodotti importati, e la costante sorveglianza dello smaltimento dei rifiuti di cucina, di ristoranti, navi, aerei, specialmente se provenienti/transitanti da paesi infetti.

In Italia ad oggi la ASF persiste soltanto in Sardegna, dove l'endemicità dell'infezione è facilitata da diversi fattori (pratiche di allevamento tradizionale, caratteristiche intrinseche del territorio, co-presenza di animali selvatici e domestici allevati allo stato brado o semi-brado).

Virus della Peste Suina Classica

In Italia non vengono riportati casi di Peste Suina Classica (PSC) dal 2003. La sorveglianza avviene attraverso i controlli sierologici contestualmente ai prelievi effettuati nell'ambito dell'attività di sorveglianza prevista dal Piano di Sorveglianza per Malattia Vescicolare del Suino. La circolazione del virus è dimostrata nel cinghiale, ponendo molti interrogativi sul passaggio del virus dal selvatico al domestico, soprattutto in condizioni di allevamento brado o semibrado, già per altro analizzati durante il focolaio di Varese del 1997 (Brugola et al., 1998).

Bibliografia

1. Angeloni et al., 2011. Atti del IV Workshop Nazionale di virologia veterinaria, p 12
2. Brendtsson et al., 2006. Proceedings of the 19th IPVS Congress, Volume 2, p 145
3. Bresaola et al., 2010. Atti XXXVI congresso SIPAS, pp239-347
4. Bridger J.C., 1980. Vet Rec 107:532-533
5. Brugola et al., 1998. L'osservatorio 1998 (10)
6. Canelli et al., 2012 a. Atti XXXVIII congresso SIPAS, p 261
7. Canelli et al., 2012 b. Atti XXXVIII congresso SIPAS, p 267

8. Caprioli et al., 2005. O&V 11:37-46
9. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Influenza A (H3N2) Variant Virus <http://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-cases.htm>
10. Cornelissen-Keijsers et al., 2012. J Gen Virol 93(12): 2682-2691
11. Dell'amico et al., 2010 Biologia Italiana. 7:15-29
12. Di Bartolo et al., 2008. Vet Microbiol 126:74-81
13. Di Bartolo et al., 2009 a. Atti del III Workshop Nazionale di virologia veterinaria, p 43
14. Di Bartolo e coll., 2009b. Atti del III Workshop Nazionale di virologia veterinaria, p 45
15. Di Martino et al., 2011. Vet Microbiol 149:221-224
16. Di Martino et al., 2012a. Arch Virol 157 (12):2393-2396
17. Di Martino et al., 2012b. J Gen Virol 93(1):102-105
18. Guercio et al., 2012. J En Viron Biol 33 (2):155-157
19. Indik et al., 2006. Vet Microbiol 117:276-282
20. L'Homme et al., 2009. Arch Virol 155(6):839-846
21. Lan et al., 2011. Arch Virol 156(10): 1869-1879
22. Lavazza e Perini, 1990. Atti Soc Ital Sci Vet 44(7):765-768
23. Lavazza et al., 2008. Proceedings of the 20th IPVS Congress., p 80
24. Lorincz et al., 2011. Proceedings of the 6th International Symposium on Emerging and re-emerging pig diseases, p 332
25. Maione et al., 2011. Atti del IV Workshop Nazionale di virologia veterinaria, p 58
26. Martella et al., 2008 a. Virus Genes 36:365-373
27. Martella et al., 2008b. J Clin Microbiol 46(6):1907-1913
28. Martelli F. et al., 2006. Atti del X congresso SIPAS, 238-9 hev
29. Martelli F. 2006. J Vert Med 53:234-238 ttv
30. Martinelli et al., 2009. Atti XXXV congresso SIPAS, pp 431-437
31. Moreno et al., 2010. Open Vir J 5;4:52-56
32. Pigantelli et al., 2009. Virus Res 143 (1): 33-43
33. Ponterio et al., 2011. Atti del IV Workshop Nazionale di virologia veterinaria, p 76
34. Reuter et al., 2010. J Clin Microbiol 48(2):363-368
35. Reuter et al., 2011. Rev Med Virol 21(1):32-41
36. Sanchez-Vizcaino et al., 2011. Proceedings of the 6th International Symposium on Emerging and re-emerging pig diseases, p 29
37. Wang et al. 2007. Vaccine 25:5453-5466

TAVOLA ROTONDA

**IL CINGHIALE COME POTENZIALE RISCHIO
PER L'ALLEVAMENTO SUINO**

ECOLOGIA DEL CINGHIALE E RISCHI SANITARI PER GLI ALLEVAMENTI SUINICOLI

VITTORIO GUBERTI

*Istituto Superiore Protezione e Ricerca Ambientale (ISPRA)
Ozzano E. (BO)*

INTRODUZIONE

Il cinghiale in Italia ha dimostrato una enorme capacità di crescita demografica, sia intermini di densità locale sia in termini di distribuzione geografica (Carnevali et al., 2009) . Si pensi che nell'Appennino settentrionale negli anni '60 la specie non era presente e, ad oggi, si stimano in almeno 30000 i capi presenti nella sola Emilia Romagna. Molti sono i motivi che possono spiegare la diffusione del cinghiale e tra questi: inverni miti, disponibilità di alimenti per tutto l'anno, elevata fecondità e fertilità della specie. Nonostante i numerosi piani di controllo (unitamente alla forte pressione venatoria cui la specie è sottoposta) il cinghiale non accenna a diminuire, al massimo si riesce a stabilizzarne presenza geografica e densità. Tale situazione, a prescindere dall'impatto sull'agricoltura, impone di includere il cinghiale tra le specie in grado di assumere il ruolo di serbatoio epidemiologico di alcune importanti infezioni/malattie che colpiscono gli animali domestici ed in particolare il maiale, non bisogna infatti dimenticare che il maiale altro non è che la forma domestica del cinghiale. Le due infezioni esemplificative per tale situazione epidemiologica sono le peste suine. Entrambe (peste suina classica e africana) sono malattie di notevole gravità del comparto suinicolo sia per i danni diretti (mortalità, calo delle produzioni ecc) sia per quelli indiretti (blocco movimentazioni, abbattimento, zona infetta e di protezione ecc.). Entrambe le infezioni (ovvero la presenza del virus anche in assenza di sintomatologia clinica, malattia) devono essere denunciate internazionalmente, mentre l'infezione nel cinghiale deve essere solo notificata anche se una serie di misure devono essere comunque attuate al fine di mitigarne la diffusione. E' necessario sottolineare come la persistenza di PSC nel cinghiale in un territorio sia un importantissimo fattore di rischio sia per l'introduzione del virus nell'allevamento suino. In Germania il 60% (Fritzemeier et al., 2000) dei casi primari di PSC nell'allevamento suino sono stati dimostrati essere epidemiologicamente correlati alla presenza di PSCF nel cinghiale. In Italia, durante le epidemie di PSC nel cinghiale sia della Maremma Toscana sia della provincia di Varese, tutti i casi di infezione del maiale domestico sono stati correlati alla presenza del virus nel selvatico ed in entrambe le aree tutti gli allevamenti suinicoli hanno dovuto cessare le attività a seguito delle misure di restrizione in atto.

DISTRIBUZIONE GEOGRAFICA ED EPIDEMIOLOGIA NEL CINGHIALE

La peste suina classica

La PSC è distribuita (o sospettata di esserlo) in tutta l'Europa non comunitaria (Russia inclusa). Il virus si trasmette per contatto diretto o per ingestione di carni (alimenti) contaminati (Artois et al., OIE) . I casi primari del cinghiale sono sempre stati determinati da: alimentazione dei selvatici con alimenti (anche per l'alimentazione umana) infetti, liberazione illegale di soggetti allevati con sintomi clinici, contatto tra individui allevati infetti e selvatici recettivi, contatto con popolazioni selvatiche infette. Affinché il virus possa dare origine a un'epidemia è necessario un minimo numero di soggetti recettivi (densità sogli di trasmissione) che di solito è di circa 1 animale per km²; l'epidemia può persistere assumendo un andamento endemico oppure auto-estinguersi. L'epidemia si auto estingue quando il tasso di reclutamento di nuovi

individui recettivi è minore del tasso di trasmissione dell'infezione. L'equilibrio endemico alle nostre latitudini e con le caratteristiche demografiche dei cinghiali nell'area mediterranea si ha quando la popolazione colpita è composta da almeno 4.000 individui (Comunità Critica di Mantenimento). Attualmente è disponibile un protocollo per la vaccinazione orale delle popolazioni di cinghiale infette utilizzando un vaccino vivo attenuato (C strain) in attesa che vengano completate le ricerche sul nuovo vaccino marker che dovrebbe, in tempi futuri, sostituire quello vivo attenuato (EFSA, 2009).

LA PESTE SUINA AFRICANA

In Europa la PSA è attualmente distribuita in Sardegna, Caucaso, Russia europea e recentemente si è verificato un focolaio in Ucraina. Il serbatoio epidemiologico naturale dell'infezione è la tana del facocero in cui coesistono zecche molli del genere *Ornithodoros* e diverse classi d'età del suide selvatico. Le zecche infettano i nuovi nati che, con una fase viremica, amplificano il virus, a loro volta infettando nuove zecche e facoceri recettivi per contatto diretto. I giovani una volta guariti non eliminano più sufficienti quantità di virus da infettare – per contatto diretto – alcun animale. Possono comunque mantenere per lunghi periodi bassi livelli di viremia sufficienti però ad infettare nuove zecche (FAO, 2009). I maiali nell'area raramente si infettano per contatto diretto con i facoceri viremici ma dalle zecche. Erroneamente i maiali sopravvissuti all'infezione vengono definiti come eliminatori cronici. In realtà i maiali sopravvissuti (e probabilmente anche i cinghiali) hanno il virus silente in alcuni distretti linfonodali (in genere retro-faringei e mesenterici) che se utilizzati per l'alimentazione di suini recettivi trasmettono l'infezione. I maiali sopravvissuti non sono in grado di infettare per contatto diretto alcun suino recettivo. In Europa, generalmente, l'infezione viene introdotta tramite alimenti contaminati/infetti (come avvenne diversi anni fa in Sardegna e di recente nel Caucaso) e si diffonde tramite contatto diretto tra suini infetti e recettivi (EFSA, 2010). Il cinghiale si inserisce nel ciclo epidemiologico del maiale e – ad oggi – non ha mai assunto il ruolo di vero serbatoio epidemiologico dell'infezione. Nelle aree a religione Musulmana del Caucaso (Cecenia ad esempio) il cinghiale ha comunque permesso all'infezione di mantenersi e di propagarsi a zone con elevata densità di suini domestici (Sud della Russia). In Europa, ad eccezione della penisola Iberica, la presenza delle zecche del genere *Ornithodoros* è scarsa o assente anche se gli studi disponibili sono altrettanto scarsi o tecnicamente non convincenti. Per la PSA non sono disponibili stime né della Densità Soglia di trasmissione né della Comunità Critica di Mantenimento. Nessun vaccino è mai risultato protettivo.

MISURE DA APPLICARSI

In caso di introduzione di PSC o PSA in una popolazione di cinghiali la legislazione vigente prevede che si organizzi una area infetta basata sulla distribuzione spaziale della popolazione (o meta popolazione) di cinghiale infetta (Montinaro, 2012). Dal punto di vista ecologico tutti i cinghiali che vivono in continuità di areale sono a rischio di contrarre l'infezione. Data l'attuale distribuzione spaziale del cinghiale in Italia è evidente come le aree infette debbano essere per forza molto ampie. Nell'area infetta anche la popolazione di suini domestici è soggetta a restrizioni della movimentazione, modelli di sorveglianza accurate e costosi (art. 15, DLvo 55/2004). Gli allevamenti posti nell'area infetta da cinghiale sono, in sintesi, fortemente penalizzati.

IL RISCHIO PER L'EUROPA COMUNITARIA E L'ITALIA

L'Europa (a parte Sardegna e pochi hot spot in Romania e Bulgaria) è indenne sia da africana

sia da classica. Tuttavia sia possibili scambi commerciali illegali sia l'introduzione di derrate alimentari originate da animali infetti importate da viaggiatori potrebbero originare un'epidemia. L'introduzione a causa dell'uomo può avvenire in ogni punto dell'Europa (e quindi dell'Italia) a condizione che sia presente un'importante popolazione di cinghiali o l'allevamento del suino a bassa biosicurezza (allevamento familiare). L'introduzione in Europa può avvenire anche attraverso il cinghiale, laddove vi è continuità di areale tra le popolazioni dei Paesi infetti e Paesi europei confinanti come potrebbe essere tra Ucraina e Ungheria, Bielorussia e Polonia. Per tali motivi la UE ha incrementato i livelli di sorveglianza nelle aree considerate a rischio (EFSA, 2010). Infine, un problema tutto Italiano: ogni ulteriore giorno di presenza del virus in Sardegna equivale ad un aumento del rischio per la suinicoltura nazionale.

INDIVIDUAZIONE PRECOCE DELL'INFEZIONE: DEFINIZIONE DI CASO SOSPETTO E LIVELLI DI RISCHIO

Mentre per il maiale la legislazione prevede un'attenta sorveglianza sia attiva sia passiva, per il cinghiale la situazione appare meno strutturata. Al fine di minimizzare l'estensione delle zone infette da peste nel cinghiale, e quindi le ripercussioni negative sul comparto suinicolo, è necessario individuare il più precocemente possibile l'eventuale introduzione delle infezioni in un territorio. Tecnicamente il metodo vincente è la sorveglianza passiva. In tale contesto diverse definizioni di caso sospetto possono originare diversi livelli di accuratezza della sorveglianza, livelli che devono essere modulati dal rischio dell'area interessata. Oggi giorno la probabilità di introduzione diretta di PSC o PSA nelle popolazioni indenni di cinghiali della penisola viene ritenuto relativamente basso (ma non trascurabile) e quindi una definizione di caso sospetto relativamente stretta può essere applicata, ad esempio: "cluster di mortalità con due o più cinghiali trovati morti nell'arco di una settimana in un'area di circa 100-150 Km²". Nel caso il rischio sia maggiore (ad esempio l'infezione presente in una nazione confinante con l'Italia e con una popolazione di cinghiali in continuità di areale) la definizione di caso sospetto adottato sarà: "Tutti i cinghiali trovati morti inclusi gli investiti o abbattuti in condizioni anormali" per le regioni confinanti, mentre potrà rimanere invariato per le regioni più distanti dalla nazione infetta.

Il sistema è semplice, efficiente ed economico a condizione che le procedure di trasmissione delle informazioni e delle successive azioni siano ben chiare e funzionanti ad ognuno dei livelli della catena ed in particolare tra servizi faunistici e veterinari.

CONCLUSIONI

Le pesti nel cinghiale non rappresentano esclusivamente un problema di gestione o di conservazione della biodiversità, quanto piuttosto un problema di sanità pubblica veterinaria. Sebbene il rischio di introduzione diretta dei virus nella penisola possa ritenersi basso è necessario mantenere quel minimo di allerta previsto per tutte le infezioni denunciabili internazionalmente ed in particolare nella UE. La presenza di una epidemia di Peste (indipendentemente se Classica o Africana) in una popolazione di cinghiale comporta l'applicazione di misure restrittive anche nel comparto suinicolo (animali vivi e loro prodotti). L'estensione dell'area in cui tali misure di restrizione andranno applicate dipende dalla situazione epidemiologica della malattia nel cinghiale. Appare scontato che, più presto l'eventuale introduzione del virus verrà rilevata minore sarà l'estensione dell'area infetta e di conseguenza minore sarà anche il numero di allevamenti suini coinvolti. Nel mondo globalizzato, in cui le infezioni degli animali domestici rappresentano l'unica vera e propria barriera commerciale, è necessario allestire sistemi di sorveglianza efficienti e sostenibili

anche a carico della fauna selvatica. Sistemi di sorveglianza in cui le diverse competenze istituzionali vadano rispettate e valorizzate così come le capacità tecniche delle persone direttamente coinvolte.

BIBLIOGRAFIA

Carnevali L., L. Pedrotti, F. Riga, S. Toso. 2009, Banca dati ungulati. Rapporto ISPRA 2001-2005, Biologia e Conservazione della Fauna 117, 1-159

<http://www.isprambiente.gov.it/it/pubblicazioni/documenti-tecnici/banca-dati-ungulati-status-distribuzione>

EFSA, 2009. Scientific Opinion on the Panel on AHAW on a request from Commission on: "Control and Eradication on Classical Swine Fever in Wild Boar". The EFSA Journal, 1-18 including the Scientific Report (19-190)

[https://www.google.it/search?sourceid=navclient&hl=it&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA_itIT418IT418&q=The+EFSA+Journal+\(2009\)%2C+932+1-18](https://www.google.it/search?sourceid=navclient&hl=it&ie=UTF-8&rlz=1T4ADSA_itIT418IT418&q=The+EFSA+Journal+(2009)%2C+932+1-18)

Fritzemeier J., Teufert J., Greiser-Wilke I., Staubach C., Schluter H., Moenning V., 2000. Epidemiology of Classical Swine Fever in Germany in the 1990s. Veterinary Microbiology 77: 29-41.

Artois M., K.R. Depner, V. Guberti, J. Hars, S. Rossi, D. Rutili, 2002. Classical Swine Fever (hog cholera) in wild boar in Europe. (Revue Scientifique et Technique de l'Office internationale des Epizooties 21(2):287-3003.

<http://ela-europe.org/ELA%20teksten/classical%20swine%20fever/M.%20Artois%20et%20al.pdf>

FAO, 2009. Preparation of African swine fever contingency plans. Edited by M.L. Penrith, V. Guberti,

K. Depner and J. Lubroth. FAO Animal Production and Health Manual No. 8. Rome <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i1196e/i1196e00.pdf>

Montinaro, 2012. Sanità Animale. Poletto Editore, Vermezzo (MI).

EFSA, 2010. Scientific Opinion on African Swine Fever. The EFSA Journal 2010; 8(3):1556 [149 pp.].

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1556.pdf>

ORGANIZZAZIONE E RISULTATI DEI PIANI DI MONITORAGGIO SULLO STATO SANITARIO DEL CINGHIALE

MONITORING PLANS OF WILD BOAR HEALTH STATUS: ORGANIZATION AND RESULTS

GIANLUCA RUGNA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Modena, Italy

Key Words: *Sus scrofa*, wild boar, health status, monitoring, zoonosis

Abstract: The wild boar (*Sus scrofa*) population density is increasing worldwide, leading to a higher contact rate among animal hosts. The knowledge of diseases circulating in wildlife populations is important for wild species conservation, livestock production and for public health. In this paper the Author reports the wild boar health status evaluated within a monitoring program of wildlife diseases implemented in Emilia-Romagna region, Italy. Samples from 54,802 wild boars were collected during 6 hunting seasons. No antibodies against CSFV were detected, while the ADV prevalence rates were 31.9%, 35.2%, 21.6%, 31.3%, 31.7% and 27.5% in 2006, 2007, 2008, 2009, 2010 and 2011 respectively. Seroprevalence to *Toxoplasma gondii* was 16.7% and *Trichinella* spp. larvae were detected in 1 out of 54,801 wild boars. The parasite was identified as *T. pseudospiralis* by multiplex PCR. The monitoring plan showed the circulation of *Brucella suis* biovar 2 in the regional wild boar population and the absence of *Mycobacterium bovis*. In this paper the results of other wild boar monitoring plans are reviewed and compared.

INTRODUZIONE

Negli ultimi decenni si è assistito in molte aree del Mondo ad un marcato aumento della densità di popolazione di cinghiale (*Sus scrofa*) ed alla contemporanea espansione geografica della specie. Alla fine del XVII secolo il cinghiale era scomparso da differenti aree dell'Europa, ma durante la seconda metà del XX secolo il numero è tornato ad aumentare ancora (Ruiz-Fons *et al.*, 2008) e ciò è dovuto ad una serie di fattori, come le modificazioni nella pianificazione dell'attività venatoria, le mutazioni climatiche e l'aumento delle disponibilità alimentari, soprattutto in aree coltivate in maniera intensiva. In alcuni casi una scorretta gestione della fauna selvatica ha portato ad una sovrabbondanza del cinghiale in alcuni territori (Gortazar *et al.*, 2006). E' chiaro che un'alta densità di popolazione in un'area pone problemi sia di tipo ecologico sia di tipo sanitario. Il cinghiale può fungere da ospite di importanti agenti infettivi che possono poi essere trasmessi al suino domestico e ad altre specie, incluso l'uomo. L'attività venatoria ed il consumo di carne di cinghiale in alcune aree geografiche forniscono grandi opportunità di contatto diretto tra uomo e cinghiale. Altro aspetto molto importante da considerare è che la presenza di una specie serbatoio in un dato territorio può essere motivo di interferenza nelle campagne di eradicazione delle malattie infettive negli animali d'allevamento (Meng *et al.*, 2009).

Alcuni aspetti ecologici ed etologici del cinghiale possono avere rilevanza nella trasmissione delle malattie, come la struttura sociale ed il comportamento gregario. Il tasso di contatto tra individui e la diffusione di malattie infettive possono essere davvero alti specialmente nei dintorni di fonti di cibo e di acqua. L'*home-range* del cinghiale è in genere limitato, ma può variare in base alla disponibilità di alimento, alla struttura del territorio e al

disturbo provocato dalle attività venatorie; tutti questi fattori ambientali possono portare all'estensione dell'*home-range* fornendo anche in questo caso la possibilità di una maggiore diffusione di agenti infettivi. Il cinghiale è una specie onnivora e la sua attività di "spazzino" aumenta la probabilità di infezione da microrganismi a trasmissione alimentare (trichinellosi, toxoplasmosi). Tutte queste considerazioni mettono in luce l'importanza di un sistema di sorveglianza dello stato sanitario della fauna selvatica, come raccomandato infatti dalla Direttiva Europea (EU) 92/45/CEE.

In Emilia Romagna il cinghiale rappresenta una delle specie più diffuse tra gli ungulati. Un piano di monitoraggio regionale è stato pianificato e via via implementato a partire dal 2006 ed include il cinghiale tra le specie campionate.

In questo lavoro vengono riportati i risultati sulle prevalenze di alcune patologie nella popolazione di cinghiale dell'Emilia Romagna e questi vengono confrontati con i dati, reperiti in bibliografia, su attività di sorveglianza o studi di prevalenza effettuati in altre regioni d'Italia e in alcuni Stati europei.

LO STATO SANITARIO DEL CINGHIALE IN EMILIA ROMAGNA. CONFRONTO CON ALTRE AREE GEOGRAFICHE

Il territorio dell'Emilia Romagna copre un'area di 22.124 km² e approssimativamente metà di essa (48% del territorio) comprende i territori pianeggianti della valle del Po, mentre la restante parte della Regione è coperta da colline (27%) e montagne (25%). La popolazione di cinghiale dell'Emilia Romagna è aumentata negli ultimi 20 anni e questi animali rappresentano una delle specie più importanti per l'attività venatoria. Infatti annualmente vengono abbattuti circa 20.000 cinghiali durante la stagione di caccia. L'80% della produzione suinicola italiana è concentrata in Nord Italia (Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, Piemonte) e in Emilia Romagna ritroviamo la maggior densità soprattutto nelle zone pianeggianti lungo il fiume Po. Gli allevamenti intensivi di suino sono concentrati in un'area che non coincide con l'areale di distribuzione del cinghiale, ma in anni recenti è cresciuto l'interesse per l'allevamento estensivo del suino, soprattutto nelle aree marginali collinari-montuose. Almeno teoricamente queste modificazioni possono aumentare le possibilità di contatto tra i cinghiali e i suini domestici. Di seguito vengono brevemente definite le patologie incluse nel piano regionale di monitoraggio e il ruolo epidemiologico che il cinghiale può giocare come fonte di infezione per l'uomo e gli animali domestici. I dati sullo stato sanitario del cinghiale in Emilia Romagna sono stati riportati da Rugna *et al.* nel 2011 e vengono qui presentati. Per le singole patologie vengono forniti i risultati di attività di monitoraggio condotte in aree geografiche italiane ed europee, tratti da pubblicazioni reperite in letteratura.

Malattie virali

Peste Suina Classica (PSC): l'agente eziologico è un virus membro della famiglia Flaviviridae, genere *Pestivirus*. LA PSC è una patologia notificabile secondo l'OIE ed è un'importante patologia virale che causa serie perdite economiche nel comparto suinicolo, sia dirette (mortalità, ritardi di crescita, problemi riproduttivi) che indirette (restrizioni commerciali sulla movimentazione di animali vivi e di loro prodotti). La suscettibilità, i segni clinici e le lesioni anatomopatologiche nel cinghiale sono indistinguibili da quelle nel suino, come dimostrato in infezioni sperimentali. (Depner *et al.*, 1995).

Malattia di Aujeszky: la malattia è causata da Suid (alpha) herpesvirus. L'ospite naturale dell'infezione è rappresentato dai suidi, sia domestici che selvatici, ma il virus può infettare un ampio range di mammiferi (eccetto uomo e primati maggiori), in cui causa una patologia neurologica ad esito fatale (Peisak & Truszczyński, 2006). Nel suino domestico si osservano

disturbi riproduttivi e sintomatologia respiratoria. La malattia di Aujeszky è una importante patologia del comparto suinicolo, tanto che in molti Paesi sono stati messi in piedi programmi di eradicazione e nelle aree in cui il virus è ancora presente ad alte prevalenze vengono effettuate campagne di vaccinazione per il controllo della patologia. Nel cinghiale l'infezione è di solito asintomatica, ma non può essere escluso l'emergere di nuovi e più virulenti ceppi virali, specialmente in popolazioni ad alta densità.

I dati raccolti negli anni 2006-2011 da 13.167 campioni hanno escluso la circolazione di PSC nella popolazione di cinghiale dell'Emilia Romagna. Negli ultimi decenni la malattia nel cinghiale è risultata essere un serio problema in Europa con un forte impatto sull'allevamento industriale del suino. Durante questo periodo il virus è stato diagnosticato in Austria, Francia, Germania e Italia (Artois *et al.*, 2002). In Europa le popolazioni di cinghiale sono viste come potenziale serbatoio di PSC e sono stati spesso riportati collegamenti epidemiologici tra focolai nel cinghiale e nel suino (Rutigliano *et al.* 1997). Attualmente il virus della PSC non è presente nel suino domestico dell'Europa occidentale, ma circola nelle popolazioni di cinghiale dell'Europa centrale e orientale (Artois *et al.*, 2002). In Emilia Romagna l'ultimo focolaio nel cinghiale è stato nel 1995; il focolaio è iniziato in settembre e si è estinto a gennaio 1996. I focolai di PSC sono di solito considerati autolimitanti nelle popolazioni selvatiche, anche se alcuni autori hanno descritto casi di circolazione di lunga durata (anche alcuni anni) (Laddomada, 2000). Nel 1997 un focolaio di PSC è scoppiato in Lombardia nel cinghiale e in suini a contatto e l'ultimo cinghiale virologicamente positivo è stato trovato nel luglio del 2000. E' chiaro che in situazioni di persistente circolazione nel cinghiale, il rischio di trasmissione del virus al suino domestico rimane alto, da cui deriva l'importanza di monitoraggio sierologici.

Nello stesso periodo (2006-2011) la siero-prevalenza per Malattia di Aujeszky in Emilia Romagna si è collocata nel range 21,6% - 35,2%. In diversi Paesi europei è stata registrata un'alta prevalenza dell'infezione, come Francia, Italia, Germania e Spagna (Albina *et al.*, 2000; Lari *et al.*, 2006; Muller *et al.*, 1998; Ruiz-Fons *et al.*, 2007). Alcuni autori escludono il ruolo del cinghiale come serbatoio di virus della malattia di Aujeszky per il suino domestico; ci sono evidenze scientifiche che le infezioni in cinghiali e suini non sono correlate ed hanno cicli epidemiologici differenti. Comunque studi sperimentali suggeriscono che non c'è un "rischio zero" di trasmissione al suino domestico, perché i cinghiali infetti possono eliminare quantità di virus tali da poter scatenare l'infezione; in un report i cinghiali sono stati dimostrati responsabili di focolai di malattia di Aujeszky in suini allevati all'aperto (Hars & Rossi, 2005). Da non sottovalutare sono le possibili implicazioni per quanto riguarda la conservazione della fauna selvatica, poiché sono stati descritti casi letali in specie carnivore protette come il lupo, l'orso e la lince.

Malattie parassitarie

La trichinellosi è una patologia parassitaria causata da nematode del genere *Trichinella*, che generalmente infetta specie carnivore, ma anche mammiferi onnivori, specialmente quelli con attività necrofagica, come volpi, orsi e cinghiali. Alcune specie di *Trichinella* possono infettare uccelli e rettili (Gottstein *et al.*, 2009). La trasmissione del parassita è di tipo diretto, tramite ingestione di tessuti muscolari infestati. L'uomo può rappresentare l'ospite accidentale di *Trichinella* spp. e l'infestazione è dovuta all'ingestione di carne cruda o poco cotta. In molte regioni europee l'infestazione da *Trichinella* spp. negli animali domestici è scomparsa, sebbene si verificano foci sporadici ed il principale serbatoio è rappresentato

dalla fauna selvatica (Pozio *et al.*, 2009). Il Regolamento Europeo (EU) 2075/2005, che armonizza i controlli ufficiali nei confronti di *Trichinella* spp. nella carne, richiede che siano attuati programmi di monitoraggio nella fauna selvatica per l'ottenimento della qualifica di indennità da *Trichinella* negli allevamenti di suino.

La toxoplasmosi è una patologia parassitaria causata da *Toxoplasma gondii*, protozoo a diffusione mondiale. L'ospite definitivo è rappresentato da carnivori appartenenti alla famiglia *Felidae*, nei quali esso completa la fase della riproduzione sessuata e dai quali è eliminato come oocisti nelle feci. L'ospite intermedio è rappresentato da tutti gli animali a sangue caldo (mammiferi e uccelli), uomo incluso. Nell'ospite intermedio il parassita forma cisti soprattutto nel tessuto muscolare e nervoso e occasionalmente in organi viscerali come polmoni, fegato e reni (Dubey and Beattie, 1988). Tutti gli stadi riproduttivi (sporozoiti nelle oocisti, bradizoiti e tachizoiti nelle cisti muscolari) sono infettanti sia per gli ospiti definitivi che intermedi. Diversi autori hanno riportato la presenza diffusa di *T. gondii* nel cinghiale, che diventa infetto tramite l'ingestione di cibo o acqua contaminate con oocisti sporulate o per ingestione di cisti tissutali presenti in tessuti muscolari infestati, a causa delle abitudini di "spazzino". La presenza di cisti tissutali in questo ospite può rappresentare un problema sanitario per l'uomo.

Dal 2006 il monitoraggio condotto in Emilia Romagna su 54.802 cinghiali abbattuti ha rivelato assenza di circolazione di *T. spiralis* e *T. britovi* in questa specie; entrambe queste specie sono la più importante causa di trichinellosi nell'uomo. Dall'altro lato nel 2010 un giovane cinghiale cacciato in provincia di Bologna è risultato positivo per *Trichinella pseudospiralis*, è ciò ha rappresentato il primo report italiano di ritrovamento di questa specie in un mammifero (Merialdi *et al.*, 2011). *T. pseudospiralis* è stata segnalata come causa di focolai umani in Francia (Ranque *et al.*, 2000).

La sieroprevalenza di *T. gondii* in Emilia Romagna era 17,3% (CI 95%: 13,9-21,3%) nel 2010 (meat-juice) e 16,7% (CI 95%: 15,4-18,1%) nel 2011 (siero). I tessuti muscolari di cinghiali sieropositivi sono stati testati mediante PCR e prova biologica nel topo, ma soltanto 3/95 cinghiali sono risultati positivi per cisti di *T. gondii* in PCR e tutti negativi alla prova biologica. I risultati divergenti tra test diagnostico diretto e indiretto suggeriscono che sebbene la sierologia possa essere considerata utile per monitoraggi epidemiologici, non può essere utilizzata come un indicatore della presenza di cisti muscolari vitali di *T. gondii*. Alti tassi di sieroprevalenza di *T. gondii* sono stati riportati in diversi stati europei: 23% in Francia (Beral *et al.* 2012), 24,4% nei Paesi Bassi (Opsteegh *et al.*, 2011), 36,3% in Spagna (Ruiz-Fons *et al.*, 2006), 26,2% in Repubblica Ceca (Bartova *et al.*, 2006). La diffusione di *T. gondii* nel cinghiale può essere spiegata dall'esposizione ad aree con alta fecalizzazione felina o al comportamento cannibalistico di questa specie. Sebbene siano stati riportati pochi casi umani correlati al consumo di carne di cinghiale (Choi *et al.*, 1997), il tasso di prevalenza suggerisce che è opportuno non sottovalutare la possibilità di infezione dovuta al consumo di carne di selvaggina poco cotta o alla manipolazione delle carcasse di questi animali.

Malattie batteriche

Tubercolosi: la tubercolosi bovina (bTB) è causata da *Mycobacterium bovis*, un microrganismo membro del *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MtbC). Questo batterio ha un ampio spettro d'ospiti animali, sia domestici che selvatici, e può essere la causa della tubercolosi zoonotica (TB) (Naranjio *et al.*, 2008). Nonostante l'efficacia del test di

intradermoreazione nell'identificazione dei bovini infetti, la patologia non è stata eradicata in tutti i Paesi, spesso a causa della presenza di animali selvatici serbatoio (Amanfu, 2006). Per questo motivo l'identificazione della specie selvatica *reservoir* è importante per l'implementazione dei piani di eradicazione. Il cinghiale è usualmente considerato come ospite a "fondo cieco" (spillover) piuttosto che come ospite di mantenimento, sebbene nel tempo il suo stato epidemiologico può cambiare in base a particolari fattori di rischio locali, come evidenziato in Spagna (Naranjo *et al.*, 2008). A causa del suo comportamento trofico (onnivoro e spazzino) il cinghiale rappresenta un'ottima fonte di informazione circa la presenza di *M. bovis* nella fauna selvatica. La principale via di infezione per l'uomo è rappresentata dall'inalazione di aerosol contaminato ed il consumo di latte, mentre non è mai stata documentata l'infezione tramite ingestione di carne. La manipolazione di tessuti infetti durante le pratiche di scuoiatura ed eviscerazione può rappresentare un importante rischio sanitario in condizioni igieniche non corrette (es. contatto delle mani con la bocca) (de la Rúa-Domenech, 2006).

Brucellosi: la brucellosi è una patologia causata da batteri appartenenti al genere *Brucella*. *B. melitensis*, seguita da *B. abortus* e *B. suis* sono le principali specie coinvolte in infezioni dell'uomo, perciò esse sono il principale target delle campagne di eradicazione. *Brucella* spp. può essere trasmessa all'uomo tramite contatto diretto con animali infetti o consumo di alimenti contaminati (di solito latte e prodotti lattiero-caseari non sottoposti a trattamento termico adeguato); in aggiunta la brucellosi è una patologia occupazionale (personale di laboratorio e operai del macello), dal momento che può essere trasmessa per aerosol. Il cinghiale, al pari del suino domestico, è particolarmente suscettibile all'infezione da *Brucella suis*. Questo microrganismo, che è stato eradicato nel suino allevato in Europa, può causare gravissimi problemi riproduttivi. Esistono 3 differenti biovar di *Brucella suis*: i biovar 1 e 3 non sono comuni in Europa, dove il biovar più comunemente isolato è il 2, il cui serbatoio naturale è rappresentato dal cinghiale e/o dalla lepre europea (*Lepus europaeus*).

Nel 2010 e nel 2011 i linfonodi sottomandibolari dei cinghiali prelevati nei centri di lavorazione della selvaggina sono stati esaminati per la rilevazione di microrganismi appartenenti al *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Rugna *et al.* (2011), hanno riportato una prevalenza molto bassa di cinghiali con lesioni linfonodali granulomatose riferibili a micobatteriosi. Così come precedentemente riportato in Lombardia, in Emilia Romagna *M. microti* è stata la specie più comunemente isolata da questo tipo di lesioni nel cinghiale. *M. microti* è endemico in alcuni roditori selvatici ed ha uno scarso significato epidemiologico negli animali domestici e nell'uomo (Gaffuri *et al.*, 2009). Il ruolo del cinghiale nell'epidemiologia della tubercolosi è ampiamente dibattuto e sono state espresse opinioni contrastanti se il cinghiale possa essere o meno fonte di infezione per gli animali domestici. Di sicuro in aree con alte prevalenze non può essere trascurato il rischio zoonotico diretto, in particolare per cacciatori e veterinari.

La diffusione di *Brucella suis* nel cinghiale è stata riportata in molti Stati europei come Italia, Spagna, Germania, Croazia (Bergagna *et al.*, 2009; Ruiz- Fons *et al.*, 2006; Al Dahouk *et al.*, 2006; Cvetnic *et al.*, 2009); in quest'ultimo Paese il cinghiale è considerato il serbatoio di *B. suis* biovar 2. In Emilia Romagna 8 cinghiali su 403 nel 2010 e 35 cinghiali su 1.121 nel 2011 sono risultati positivi per *Brucella* spp. mediante tecnica PCR. L'esame batteriologico ha portato all'isolamento di *Brucella suis* biovar 2. Questo biovar rappresenta quello meno responsabile di casi umani (EFSA, 2009) sebbene non debba essere sottovalutata la possibilità di infezione durante la manipolazione di carcasse infette.

CONCLUSIONI

In 6 anni di monitoraggio sono stati campionati ed esaminati un totale di 54.802 cinghiali per patologie batteriche, virali e parassitarie. Sebbene impegnativo in termini di risorse umane ed economiche, un piano di monitoraggio dello stato sanitario del cinghiale è assolutamente importante per la raccolta di informazioni utili alla rilevazione precoce di alcune patologie infettive con ripercussioni sulla salute umana e degli animali d'allevamento. I dati raccolti e la continua attività di sorveglianza hanno permesso di rilevare un bassissimo rischio di diffusione di una importante malattia virale come la Peste Suina Classica dal cinghiale al suino. La circolazione di virus della Malattia di Aujeszky evidenzia l'importanza di ulteriori studi per la comprensione di possibili interferenze con i piani di eradicazione nel suino. In ultimo, la presenza di toxoplasmosi, brucellosi suina e trichinellosi, anche se a bassi livelli, suggerisce il mantenimento di strette misure di biosicurezza per prevenire il contatto tra il cinghiale e i suini allevati .

BIBLIOGRAFIA

- Al Daohuc S. *et al.* (2005) Seroprevalence of brucellosis, tularaemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*, 52: 444-455
- Amanfu W. (2006) The situation of tuberculosis and tuberculosis control in animals of economic interest. *Tuberculosis*, 86: 330-335
- Artois M., Depner K.R., Guberti V., Hars J., Rossi S., Rutili D. (2002) Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Revue Scientifique et Technique, Office Internationale Epizooties*, 21: 287-303
- Albina E., Mesplède A., Chenut G., Le Potier M.F., Bourbao G., Le Gal S., Leforban Y. (2000) A serological survey on classical swine fever (CSF), Aujeszky's disease (AD) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infections in French wild boars from 1991 to 1998. *Veterinary Microbiology*, 77: 43-57
- Bartova E., Sedlak K., Literak I. (2006) Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora Caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 142-153
- Beral M, Rossi S, Aubert D, Gasqui P, Terrier ME, Klein F, Villena I, Abrial D, Gilot-Fromont E, Richomme C, Hars J, Jourdain E (2012) Environmental factors associated with the seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Wild Boars (*Sus scrofa*), France. *Ecohealth.*, 9(3):303-9
- Bergagna S., Zoppi S., Ferroglio E., Gobetto M., Dondo A., Di Giannatale E., Gennero M.S., Grattarola C. (2009) Epidemiologic Survey for *Brucella suis* Biovar 2 in a wild boar (*Sus scrofa*) population in Northwest Italy. *Journal of Wildlife Diseases*, 45 (4): 1178-1181
- Capua I., Casaccia C., Calzetta G., Caporale V. (1997) Characterisation of Aujeszky's disease virus isolated from domestic animals and wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995. *Veterinary Microbiology*, 57: 143-149
- Choi W.Y., Nam H.W., Kwak N.H., Huh W., Kim Y.R., Kang M.W., Cho S.Y., Dubey J.P. (1997) Foodborne outbreaks of human toxoplasmosis. *J. Infect. Dis.*, 175: 1280-1282
- Cvetnić Z, Spicić S, Tončić J, Majnarić D, BeniĆ M, Albert D, Thiébaud M, Garin-Bastuji B. (2009) *Brucella suis* infection in domestic pigs and wild boar in Croatia. *Rev Sci Tech.*, 28(3):1057-67.
- de la Rúa-Domenech R. (2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom : Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*, 86: 77-109
- Depner K.R., Muller A., Gruber A., Rodriguez A., Bickhardt K., Liess B (1995) Classical

- swine fever in wild boar (*Sus scrofa*) – experimental infections and viral persistence. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift, 102: 381-384
- EFSA (European Food Safety Authority) (2009) Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. The EFSA Journal, 1144: 1-112
 - Gaffuri A., Boniotti B., Sacchi C., Bertoletti I., Zanoni M.G. and Pacciarini M. (2009) Tuberculosis Control Program In Wildlife In Italy: Strategies And Results. Fifth International *M. bovis* Conference, 25-28 August 2009 Wellington, New Zealand
 - Gortazar C., Acevedo P., Ruiz-Fons F., Vicente J. (2006) Disease risks and overabundance of game species. Eur. J. Wildl. Res., 52: 81-87
 - Gottstein B., Pozio E., Nokler K. (2009) Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Control of Trichinellosis. Clinical Microbiology Reviews, 22: 127-145
 - Hars J., Rossi S. (2005) Actualités dans le domaine de la surveillance des maladies transmissibles en France (peste porcine classique, maladie ‘dAujeszky, tuberculose, brucellose, leptospirose, trichinellose, influenza aviaire, virus West Nile). Proceedings of the 23èmes Rencontres du GEEFSM, Val ‘dOrdino, Andorre)
 - Laddomada A. (2000) Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. Veterinary Microbiology, 73: 121-130
 - Lari A., Lorenzi D., Nigrelli D., Brocchi E., Faccini S., Poli A. (2006) Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy. Journal of Wildlife Diseases, 42 (2): 319-324
 - Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009) Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. Phil. Trans. R. Soc. B, 364: 2697-2707
 - Meriardi G., Bardasi L., Fontana MC, Spaggiari B, Maioli G, Conedera G, Vio D, Londero M, Marucci G, Ludovisi A, Pozio E, Capelli G. (2011) First reports of *Trichinella pseudospiralis* in wild boars (*Sus scrofa*) of Italy. Veterinary Parasitology, 178(3-4): 370-3
 - Muller T., Teuffert J., Ziedler K., Possardt C., Kramer M., Staubach C., Conraths F.J. (1998) Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany. Journal of Wildlife Diseases, 34 (2): 251-258
 - Naranjo V., Gortazar C., Vicente J., de la Fuente J. (2008) Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Veterinary Microbiology, 127: 1-9
 - Opsteegh M, Swart A, Fonville M, Dekkers L, van der Giessen J. (2011) Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelong persistence of antibodies. PLoS One, 6(1): e16240.
 - Pejsak Z.K., Trusczyński M.J. (2006) “Aujeszky Disease (pseudorabies)” in Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 9a ed., Blackwell Publishing, pp 419-433
 - Pozio E., Rinaldi E., Marucci G., Musella V., Galati F., Cringoli G., Boireau P., La Rosa G. (2009) Hots and habitats of *Trichinella spiralis* and *Trichinella britovi* in Europe. International Journal for Parasitology, 39: 71-79
 - Ranque S, Faugère B, Pozio E, La Rosa G, Tamburrini A, Pellissier JF, Brouqui P. (2000) *Trichinella pseudospiralis* outbreak in France. Emerging Infectious Diseases, 6(5): 543-547
 - Rugna G., Meriardi G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbarino C., Grazioli S., Licata E., Luppi A., Tamba M., Sozzi E., Martelli P. (2011) Five years (2006-2010) results of wild boar (*Sus scrofa*) sanitary monitoring in Emilia-Romagna region (Northern Italy). 3rd European Symposium of Porcine Health Management. Espoo (Finland), 25th-27th May 2011.
 - Ruiz-Fons F., Vicente J., Vidal D., Hofle U., Villanua D., Gauss C., Segales J., Almeria S., Montoro V., Gortazar C. (2006) Seroprevalence of six reproductive pathogens in

European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain. The effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology*, 65: 731-743

- Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Vicente J., Gortazar C. (2007) *Veterinary Microbiology*, 120: 241-250
- Ruiz-Fons F., Segalés J., Gortazar C. (2008) A review of viral diseases of the European wild boar: Effects of population dynamics and reservoir role. *The Veterinary Journal*, 176: 158-169
- Rutili G. (1997) “Country report on classical swine fever in Italy” in Report on Annual Meeting of National Swine Fever Laboratories, Vienna, Austria. Commission of the European Communities, Document VI/7888/97, p. 13

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

EFFETTO DELLA VACCINAZIONE ANTI-PCV2 SULL'ENTITÀ E DURATA DELL'ESCREZIONE VIRALE NELLE SCROFE

EFFECT OF PCV2 VACCINATION ON THE AMOUNTS AND DURATION OF VIRAL SHEDDING IN SOWS

Bianco C.¹, Sarli G.¹, Panarese S.¹, Bacci M.L.¹, Galeati G.¹, Dottori M.², Bonilauri P.²,
Lelli D.³, Leotti G.⁴, Vila T.⁵, Joisel F.⁵, Ostanello F.¹

¹*Dip. Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET), Bologna, Italy;*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER),
sezione di Reggio Emilia, Via Pitagora 2, 42100, Reggio Emilia, Italy;*

³*IZSLER, sezione di Brescia, Via A. Bianchi 9, 25124, Brescia, Italy;*

⁴*Merial Italia SpA, Strada 6, Palazzo E/5, 20090 Milanofiori, Assago, Milano, Italy;*

⁵*Merial SAS, 29 av Tony Garnier, 69007, Lyon, France*

Parole chiave: suino, circovirus suino tipo 2, seme, infezione

Keywords: Swine, Porcine circovirus type 2, Semen, Infection

RIASSUNTO

Vengono riportati i risultati di una prova condotta infettando sperimentalmente, con seme addizionato con porcine circovirus tipo 2b (PCV2b), due gruppi di scrofette di cui uno vaccinato (V) e l'altro non vaccinato (NV) nei confronti di PCV2. Nel corso della sperimentazione (55 giorni) il gruppo di soggetti NV ha presentato un maggior numero di episodi viremici ed ha eliminato il virus con maggiore frequenza per via fecale, nasale e vaginale. Nel gruppo NV, la proporzione di tessuti del comparto linfoide e riproduttivo infetti e la quantità di virus presente è risultata più elevata rispetto a quella del gruppo V. E' stata inoltre messa in evidenza la presenza di PCV2 in un feto del gruppo NV. I risultati indicano la possibilità che il vaccino limiti la diffusione endogena del virus e riduca la probabilità di trasmissione orizzontale e verticale.

ABSTRACT

The experimental trial here presented compares two groups of conventional gilts, one of which vaccinated (V) for porcine circovirus type 2 (PCV2) and one non-vaccinated (NV), both inseminated with PCV2b spiked semen. During the entire trial (55 days), the NV group showed more frequent viremia and PCV2 shedding. The tissues (lymphoid tissue set and reproductive tissue set) of the NV had a higher amount of PCV2 (percentage and virus load), and one fetal tissue positivity. This study supports effectiveness of the vaccine to limit the infection of the gilts and to reduce both horizontal and vertical transmission.

INTRODUZIONE

L'infezione da Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) rappresenta uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento suinicolo intensivo a livello mondiale. Le forme di malattia sostenute da PCV2 sono attualmente definite come Porcine Circovirus Associated Diseases (PCVADs) o Porcine Circovirus Diseases (PCVDs), rispettivamente in USA o in Europa (Opriessnig et al., 2007). Le PCVDs possono essere classificate in forme sistemiche, quali la sindrome del deperimento post-svezzamento (PMWS) o in forme localizzate quali enterite granulomatosa,

sindrome dermatite-nefrite (PDNS), forme respiratorie riconducibili alla porcine respiratory disease complex (PRDC), polmonite proliferativa e necrotizzante (PNP) e disordini riproduttivi (West et al., 1999; Harding, 2004; Kim et al., 2004; Opriessnig et al., 2007; Morandi et al., 2010; Segales, 2012).

Le problematiche riproduttive sono caratterizzate da natimortalità, mummificazione, morte embrionale, infertilità e aborto (sindrome SMEDI), in particolare in scrofette o scrofe con bassi titoli anticorpali (Cariolet et al., 2001; Madson et al., 2009; Hansen et al., 2010). Oltre a queste forme clinicamente evidenti, PCV2 è in grado di causare la nascita di suinetti viremici (Madson e Opriessnig, 2011). La trasmissione verticale o perinatale di PCV2 aumenta il rischio di infezione dei suinetti, condizionando così un aumento dell'incidenza di PCVDs. Ulteriore punto critico è la trasmissione orizzontale dell'infezione tra le scrofe gestanti.

Attualmente, un importante strumento di profilassi è rappresentato dall'utilizzo di vaccini che sono in grado sia di ridurre l'incidenza delle forme cliniche sia di limitare quantità e durata dell'escrezione virale. Nelle scrofe, la vaccinazione non solo previene i disordini riproduttivi (Pejsak et al, 2012), ma garantisce anche una buona immunizzazione passiva dei suinetti (Oh et al., 2012; Nechvatlova et al., 2011). Di conseguenza, l'efficacia della vaccinazione può essere valutata anche in funzione della riduzione del tempo e della quantità di virus eliminato da scrofe infette.

Il presente lavoro ha avuto come scopo quello di valutare se la vaccinazione anti-PCV2 fosse in grado di ridurre sia la quantità di virus eliminata dagli animali sia il numero di tessuti e di organi in cui il virus è presente. A tale scopo, sono state utilizzate delle scrofette convenzionali, considerate la categoria di riproduttori a maggior rischio nei confronti dell'infezione da PCV2 (Madson e Opriessnig, 2011), infettate sperimentalmente con seme a cui era stato addizionata una sospensione di PCV2b.

MATERIALI E METODI

Animali

Dodici scrofette convenzionali Large White sono state selezionate casualmente tra quelle presenti in allevamento, identificate individualmente e divise in modo casuale in 2 gruppi (NV: non vaccinate e V: vaccinate) composti da 6 animali ciascuno. Gli animali del gruppo V (V 1-6) sono stati vaccinati, a circa 5 mesi di età, con Circovac® (Merial, Lyon, France) nell'allevamento di origine secondo lo schema previsto dal produttore: una prima dose di 2 ml somministrata per via intramuscolare (i.m.) profonda nella regione retro-auricolare seguita da una seconda somministrazione 4 settimane dopo. A circa 160 giorni di vita gli animali sono stati trasportati nello stabulario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna e stabulati in box individuali e in due locali separati, uno per ogni gruppo. Il peso (media±dev st) era 98,5±9,4 Kg all'inizio del trattamento farmacologico.

Protocollo sperimentale

Il protocollo di sperimentazione è stato approvato dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute. Lo studio è stato condotto in accordo con quanto previsto dalla normative europea relativamente alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (Direttiva del Consiglio europeo, 86/609/EEC).

A -4 giorni dalla inseminazione artificiale (GPIA: giorni post inseminazione artificiale), a ciascun animale sono stati somministrati i.m. 1500 UI di eCG (equine chorionic gonadotropin) e a -2 giorni, 750 UI di hCG (human chorionic gonadotropin) con lo scopo di indurre il primo ciclo ovarico e di assicurare la superovulazione. Le scrofette sono state inseminate al giorno 0, circa 40 ore dopo la somministrazione di hCG. Gli animali di entrambi i gruppi sono stati inseminati con un'unica dose di seme (100 ml) a cui sono stati aggiunti 0,20 ml di una sospensione contenente $10^{4,4}$ TCID₅₀/50 µl di PCV2b. Il ceppo di PCV2b, è stato isolato nel corso di un focolaio italiano di PMWS e genotipizzato secondo i criteri proposti da Hesse et al. (2008). In via preliminare, il seme utilizzato è stato esaminato con una metodica RT-PCR per escludere la presenza di PCV2. Da +20 GPIA è stata quotidianamente eseguita un'osservazione clinica con lo scopo di evidenziare eventuali manifestazioni estrali. A +29 GPIA, è stata eseguita la diagnosi ecografica di gravidanza. Gli animali che avevano abortito o quelli risultati non gravidi sono stati soppressi. Gli animali gravidi sono stati soppressi a 52±3 GPIA.

A partire dal giorno -2 e fino alla soppressione sono stati settimanalmente prelevati campioni di sangue e sono stati eseguiti tamponi nasali, fecali e vaginali. A +14 GPIA non è stato eseguito il prelievo ematico allo scopo di non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza. Per l'intero periodo di sperimentazione, è stata misurata quotidianamente la temperatura rettale ed è stata condotta una osservazione clinica. L'accesso agli stabulari è stato limitato al solo personale qualificato e sono state applicate rigorose misure di biosicurezza.

Alla necropsia è stata valutata l'eventuale presenza di lesioni macroscopiche e sono state prelevate porzioni dei seguenti organi e tessuti: tonsille; linfonodi inguinali superficiali, del mesometrio, tracheobronchiali, mesenterici; milza (organi linfoidi); ovaie (sono stati contati follicoli, corpi lutei e corpi albicanti), salpinge, utero, cervice e vagina (animali non gravidi), feto e placenta corrispondente, piccolo intestino (duodeno digiuno e ileo), fegato, rene, cuore e polmone. Ogni feto è stato pesato e misurato per determinarne l'età (Almond et al., 2006); sono stati prelevati campioni di liquido amniotico, allantocorion e tratto uterino corrispondente, milza, cuore e fegato. Per evitare possibili cross contaminazioni è stato utilizzato strumentario chirurgico sterile. I campioni sono stati congelati per l'indagine di biologia molecolare e fissati in formalina per l'indagine istologica.

Indagini sierologiche

La determinazione dei titoli anticorpali anti PCV2 è stata condotta sui campioni di siero, analizzando diluizioni seriali in base 6; sui sieri prelevati il giorno -2 e il giorno della soppressione è stata condotta la ricerca di anticorpi anti Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV), Aujeszky's Disease virus (ADV) e Porcine Parvovirus (PPV).

La ricerca di anticorpi nei confronti di PCV2, PRRSV, ADV e PPV è stata effettuata utilizzando test ELISA competitivi standardizzati presso l'IZSLER di Brescia.

La determinazione della concentrazione del progesterone sierico (P4) è stata eseguita a -2, +7, +21, +28 e +35 GPIA (o da un prelievo eseguito prima della soppressione) utilizzando una metodica radioimmunologica (Tamanini et al., 1985).

Indagini virologiche

L'estrazione del genoma virale di PCV2 dai campioni prelevati in vivo (siero, tamponi nasali, vaginali e rettali) e alla necropsopia è stata realizzata mediante un kit commerciale (RBC Bioscience, Real Genomics), seguendo le indicazioni del produttore. L'amplificazione del DNA virale è stata eseguita mediante una tecnica di RT-PCR (Olvera et al., 2004). Per valutare il grado di omologia con il genoma del ceppo di PCV2b utilizzato, è stato sequenziato il DNA virale amplificato di 17 campioni di tessuto (sia di tessuto linfoide sia del tratto riproduttivo), scelti in modo casuale tra quelli risultati positivi all'RT-PCR. Il genoma virale è stato nuovamente estratto come descritto in precedenza e i prodotti di PCR sono stati amplificati secondo il metodo descritto da Ouardani et al. (1999). I prodotti di amplificazione dell'ORF2 sono stati sequenziati e comparati con le sequenze di riferimento depositate in Genbank (PCV2a AF465211; PCV2b HM038022.1) e con quella del ceppo utilizzato per l'infezione (PCV2b 6503, IZS – Brescia – Italy). Il Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) è stato utilizzato per determinare il grado di omologia delle sequenze, sulla base di un criterio di similarità del 98%.

Campioni ematici del giorno -2 e del giorno della soppressione sono stati esaminati mediante metodiche RT PCR per la ricerca del genoma di PRRSV, ADV e PPV rispettivamente secondo le metodiche di Bonilauri et al., 2003; Katz e Petersen, 1992; Kim et al., 2001.

Indagine istologica ed immunoistochimica

I campioni fissati in formalina sono stati inclusi in paraffina e, sezioni di 4 μ , sono state usate per la colorazione con ematossilina-eosina e per l'indagine immunoistochimica. Quest'ultima è stata eseguita solo sui campioni di tessuto che all'RT-PCR presentavano un valore di copie di genoma/g $> 10^8$. È stato impiegato l'anticorpo monoclonale anti PCV2 clone F217, secondo la tecnica descritta da Sarli et al., 2012.

Analisi statistica

Sono state valutate le seguenti variabili: media dei titoli anticorpali anti PCV2; proporzione di campioni risultati positivi alla ricerca del genoma virale di PCV2; quantità di virus (espressa come numero di copie di genoma virale di PCV2/g) nei campioni esaminati. I confronti sono stati eseguiti utilizzando il test U di Mann-Whitney per le variabili quantitative e il test chi-quadrato per quelle qualitative. La valutazione preliminare della normalità della distribuzione campionaria è stata eseguita utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnoff. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software SPSS ver. 19.

RISULTATI

Osservazioni cliniche

Al giorno 0 tutte le scrofe hanno evidenziato il riflesso di immobilità e chiari segni di estro. Nei giorni successivi all'inseminazione artificiale non è stato rilevato nessun sintomo estrale. Tre animali (NV5, V3 e V4) hanno abortito, rispettivamente, a +20, +22 e +24 GPIA. Le scrofette V1, V5, V6, NV3, NV4 e NV6 sono risultate gravide all'esame ecografico eseguito a 29 giorni. Negli animali non gravidi o che avevano abortito, i valori di P4 sono diminuiti rapidamente fino a raggiungere la concentrazione di $1,35 \pm 1,75$ ng/ml a +21

GPIA. Al contrario, i valori di P4 negli animali gravidi sono rimasti costantemente elevati ($18,60 \pm 5,28$ ng/ml a 21 GPIA).

Gli animali non gravidi sono stati sacrificati ai seguenti giorni: +34 (V2), +23 (V3), +25 (V4), +33 (NV1 e NV2), e +22 (NV5). Le scrofette gravide sono state sacrificate rispettivamente: +54 (V1), +49 (V5), +50 (V6), +51 (NV3), +49 (NV4), +55 GPIA (NV6).

Sierologia

A inizio sperimentazione tutte le scrofe erano sieropositive per PCV2. A -2, +7, +21 e +28 GPIA nessuna differenza statisticamente significativa ($P > 0,05$) è stata osservata nella media dei titoli anticorpali anti PCV2 dei due gruppi di soggetti (NV e V). A +35 GPIA la media del titolo anticorpale anti PCV2 dei soggetti del gruppo NV è risultata significativamente più alta di quella del gruppo V (M-W U test=-2,32; $p=0,019$) (Fig. 1).

Non sono stati messi in evidenza incrementi dei titoli anticorpali anti PRRSV, PPV e ADV tra il giorno -2 e il giorno dell'eutanasia; tutti i soggetti sono risultati costantemente negativi alla ricerca di anticorpi anti gE di ADV.

Indagini virologiche

Tutti i campioni individuali di siero prelevati a inizio e fine sperimentazione hanno dato esito negativo alla ricerca del genoma di PRRSV, ADV e PPV. Il DNA di PCV2 è stato messo in evidenza nei campioni di siero prelevati a -2 GPIA da 4 soggetti (NV2, NV3, NV5, NV6).

Negli animali del gruppo NV è stata osservata la maggiore proporzione di campioni ematici positivi alla ricerca del genoma di PCV2 (21 positivi su 37 esaminati: 56,7%). Al contrario, i soggetti del gruppo V sono risultati raramente viremici (2 campioni positivi su 36: 5,5%). La proporzione di campioni ematici positivi è risultata statisticamente più elevata nel gruppo NV (Chi-quadrato=21,55; $p<0,001$).

Considerando i risultati complessivi della ricerca del genoma di PCV2 dai tamponi nasali, vaginali e rettali, nel gruppo NV è stata evidenziata la più alta proporzione di campioni positivi (92 su 129 esaminati: 71,3%) rispetto a quelli provenienti dal gruppo V (31 su 126 esaminati: 24,6%) (Chi-quadrato=53,85; $p<0,001$).

Considerando le diverse tipologie di tamponi (vaginali, rettali, nasali) nei soggetti del gruppo NV, la proporzione di positività è stata sempre significativamente superiore ($p<0,001$) rispetto a quella del gruppo V (Tab. 1).

Nel tessuto linfoide i campioni provenienti del gruppo NV hanno presentato percentuali di tessuti positivi e quantità di genoma virale (numero di copie genoma/g determinate mediante real time PCR) significativamente maggiori ($p<0,001$) di quelli del gruppo V.

Valutando la proporzione di tessuti linfoidi positivi a 29 giorni (per i tessuti campionati dai soggetti non gravidi o che avevano abortito) e a 53 giorni (soggetti gravidi) è stata evidenziata una riduzione statisticamente significativa nel solo gruppo V (Fig. 2). Tuttavia, in entrambi i gruppi, la quantità di genoma virale presente nei distretti linfoidi a 53 giorni è statisticamente inferiore ($p<0,001$) rispetto a quella presente a 29 giorni.

Tabella 1: Eliminazione di PCV2 e viremia. Confronto numerico (assoluto) e proporzionale (relativo) della positività/negatività dei tamponi rettali, vaginali, nasali, e dei campioni ematici per la ricerca PCV2 in ciascuno dei due gruppi.

Table 1: PCV2 shedding and viremia. Comparison of the numeric (absolute) and percentage (relative) of rectal, vaginal and nasal swabs and of blood samples data on PCV2 assessment in the two groups.

Campione	Gruppo	Campioni positivi(%)		Campioni negativi (%)		Totale
tamponi fecali	V	12	(28,6)	30	(71,4)	42
	NV	38	(88,4)	5	(11,6)	43
	totale	50	(58,8)	35	(41,2)	85
tamponi vaginali	V	6	(14,3)	36	(85,7)	42
	NV	25	(58,1)	18	(41,9)	43
	totale	31	(36,5)	54	(63,5)	85
tamponi nasali	V	13	(31,0)	29	(69,0)	42
	NV	29	(67,4)	14	(32,6)	43
	totale	42	(49,4)	43	(50,6)	85
sangue	V	2	(5,7)	33	(94,3)	35
	NV	21	(56,8)	16	(43,2)	37
	totale	23	(68,1)	49	(31,9)	72

Nei tessuti delle vie genitali (feti compresi, se presenti) si è osservato lo stesso risultato, ovvero percentuale di tessuti positivi e titolo virale significativamente ($p < 0,001$) più basso nel gruppo dei soggetti V i quali, va precisato, hanno presentato positività alla ricerca del genoma virale nelle placente nel 39% dei casi vs il 77% nel gruppo NV. Un solo feto, proveniente da una scrofetta del gruppo NV, è risultato positivo.

Il sequenziamento ha permesso di rilevare la presenza del ceppo utilizzato per l'infezione in un caso (segmento uterino adiacente al feto 11 della scrofetta V5), mentre gli altri 16 amplificati erano omologhi alle sequenze di riferimento per PCV2a.

Figura 1. Media dei titoli anticorpali anti PCV2 (log 6) per gruppo. A +14 GPIA non è stato eseguito il prelievo ematico per non interferire con il riconoscimento materno di gravidanza.

Figure 1: Mean antibody titers to PCV2 (log 6) per group. On +14 GPIA the blood was not collected in order to do not interfere with the maternal recognition of pregnancy.

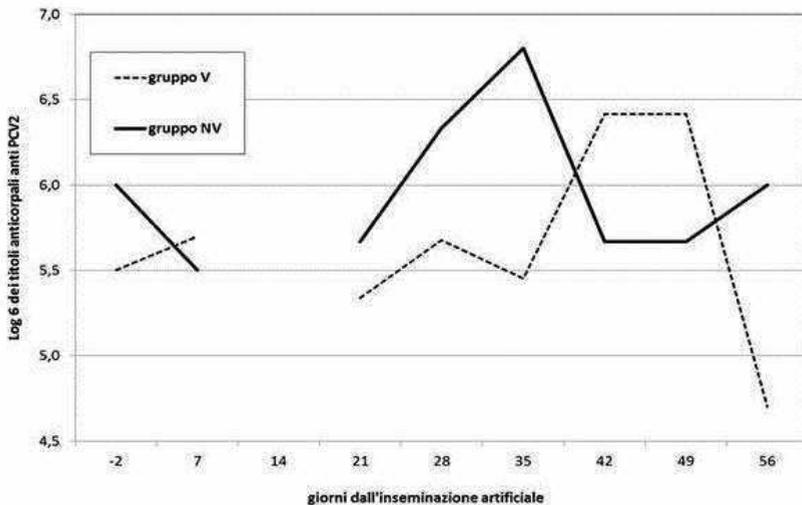
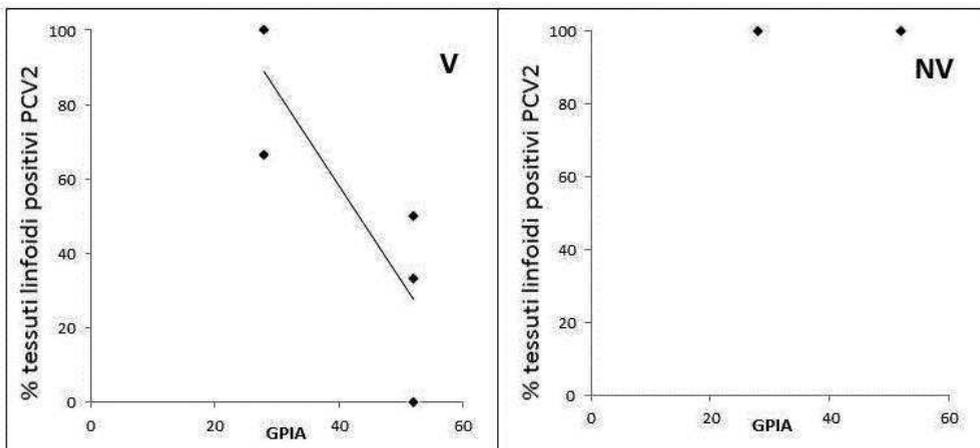


Figura 2: Clearance del PCV2. Variazione del PCV2 nei distretti linfoidi nel corso del trial nei gruppi V e NV dal +29 GPIA al +53 GPIA. Sull'asse delle ordinate è riportata la percentuale dei tessuti linfoidi positivi alla ricerca di PCV2 per mezzo della RT-PCR.

Figure 2: PCV2 clearance. PCV2 clearance in the lymphoid tissues during the trial in V and NV groups, from +29 GPIA to +53 GPIA. On vertical axis the percentage of PCV2 RT-PCR positive lymphoid tissues are reported.



Anatomia patologica, indagini istopatologiche e immunoistochimiche

L'esame necroscopico ha messo in evidenza lievi lesioni polmonari, gastriche ed epatiche compatibili con quelle di norma rilevabili in suini allevati intensivamente e non riconducibili all'azione di PCV2. Il numero delle strutture funzionali ovariche è risultato coerente con il numero di feti (numero medio di corpi lutei: $15 \pm 6,6$ e $2,6 \pm 4,4$, rispettivamente negli animali gravidi e non gravidi; numero medio di corpi albicanti nei soggetti non gravidi: $6,4 \pm 3,5$). Gli uteri dei soggetti non gravidi presentavano caratteristiche infantili.

Nei feti non sono state osservate lesioni macroscopiche e le dimensioni sono risultate compatibili con l'età gestazionale. Il numero dei feti è stato: 3, 15, 9, 10, 16, 14 rispettivamente delle scrofette V1, V5, V6, NV3, NV4 e NV6.

L'esame istopatologico non ha messo in evidenza lesioni riconducibili a PCVDs; solo in 6 campioni di tessuto linfoide (tonsille e linfonodi) provenienti dalle scrofette NV1 e NV2 sono stati identificate positività immunoistochimiche per PCV2 in rari istiociti e cellule dendritiche follicolari.

DISCUSSIONE

Nel presente lavoro, scrofe convenzionali vaccinate (V) e non vaccinate (NV) nei confronti di PCV2 sono state inseminate con seme addizionato con una sospensione virale di PCV2b. Tutti gli animali sono risultati negativi alla ricerca di ADV, PPV e PRRS e non hanno sieroconvertito nei confronti di questi patogeni potenzialmente in grado di determinare turbe riproduttive nella scrofa.

La proporzione di campioni prelevati sia in vivo sia post-mortem e risultati positivi alla ricerca di PCV2 è stata significativamente inferiore nel gruppo dei soggetti vaccinati. Analogamente, anche la quantità di virus presente nei campioni esaminati è risultata inferiore nel gruppo di soggetti vaccinati. Queste evidenze confermano il fatto che la vaccinazione, pur non impedendo l'infezione, è in grado di ridurre in modo significativo la quantità di virus eliminato dagli animali, le possibilità di replicazione dello stesso all'interno dell'organismo, la quantità di eventi viremici e, di conseguenza, le probabilità di trasmissione ai feti dell'infezione. Tali osservazioni permettono di ipotizzare che, in condizioni di campo (anche su soggetti sieropositivi e/o infetti), la vaccinazione sia efficace sia in termini di prevenzione del danno ai prodotti del concepimento sia in termini di riduzione della quantità di virus eliminato nell'ambiente riducendo così il rischio di trasmissione orizzontale alle scrofe e ai suinetti neonati.

Per quanto riguarda le vie di escrezione esaminate, si osserva come l'eliminazione fecale, che è una delle più importanti vie di escrezione, subisca una significativa riduzione nei soggetti vaccinati. Ciò ha importanti conseguenze epidemiologiche in considerazione del fatto che questa via è responsabile del mantenimento e dell'endemizzazione dell'infezione all'interno dei gruppi di scrofe.

Il titolo sierologico anti PCV2 è aumentato dopo l'infezione, raggiungendo la concentrazione massima a 35 e 42 giorni, rispettivamente nel gruppo NV e V. La diversa cinetica di produzione anticorpale nei 2 gruppi potrebbe anch'essa essere la conseguenza della maggiore circolazione virale nel gruppo NV con conseguente maggiore e più precoce stimolazione anticorpale. Non esistono dati simili in letteratura per il confronto in quanto, nelle prove sperimentali, si impiegano sempre animali non immuni o con bassissimo titolo sierologico,

quindi con notevoli divergenze tra soggetti vaccinati e non vaccinati. Comunque in una indagine (Madson et al., 2009a) il confronto tra i titoli anticorpali di un gruppo vaccinato e l'altro non vaccinato, entrambi infettati con PCV2, non dimostrò differenze di cinetica anticorpale (IgG totali) tra i 2 gruppi confrontati a partire dal 56 giorno di gestazione.

I dati ottenuti suggeriscono anche che la ridotta eliminazione di PCV2 nei soggetti V possa dipendere da una ridotta cinetica virale nei tessuti linfoidi che notoriamente rappresentano la più favorevole sede di replicazione virale. Circa la presenza del PCV2 nei tessuti linfoidi, è possibile evidenziare che, nei soli soggetti del gruppo V, la durata dell'eliminazione è inferiore, così come emerge dal confronto dei risultati della ricerca del genoma virale effettuata a 29 e 53 GPIA. In entrambi i gruppi, a 29 giorni la proporzione di campioni di tessuto linfoide positivi è identica ed estremamente elevata (100%); a 53 GPIA tale percentuale resta invariata nel gruppo NV (100%), mentre si riduce in maniera significativa al 58,33% nei soggetti V.

In nessun feto delle scrofe del gruppo V è stato messo in evidenza il genoma di PCV2, ma osservazioni interessanti emergono circa le percentuali di positività della placenta. Il virus si localizza a livello placentare contestualmente ad un episodio viremico, e la bassa percentuale di viremia nei soggetti V ha verosimilmente condizionato la più bassa positività placentare nei soggetti di questo gruppo (39%) nel confronto con quelli NV (77%).

I risultati del sequenziamento confermano a) la possibilità di co-infezione PCV2a/PCV2b (Zhai et al., 2011) almeno in alcuni dei campioni esaminati e, b) l'elevata percentuale di identità del genoma di PCV2b identificato rispetto a quello utilizzato per l'infezione. L'esperimento è stato condotto in scrofe convenzionali per simulare il più fedelmente possibile l'effetto del vaccino in condizioni di campo e, già da prima dell'infezione (-2 GPIA), alcuni soggetti erano viremici per PCV2, oltre ad essere, tutti, sierologicamente positivi. La messa in evidenza nei campioni esaminati, del genoma del ceppo di PCV2b utilizzato per l'infezione dimostra la possibilità di indurre sperimentalmente una co-infezione in soggetti già positivi per PCV2a e, in ogni caso, questa che può verosimilmente accadere anche in condizioni di campo. Va tuttavia sottolineato che, non avendo realizzato il clonaggio del DNA virale, non è possibile escludere la presenza in basse quantità del genoma di PCV2b anche nei campioni risultati positivi al solo PCV2a.

Dallo studio condotto si può concludere che la profilassi vaccinale, oltre a limitare la trasmissione verticale, riduce lo shedding virale e dunque la trasmissione orizzontale anche in scrofe convenzionali sieropositive.

BIBLIOGRAFIA

- Almond GW, Flowers WL, Batista L, D'Allaire S. (2006) "Diseases of the reproductive system" in: *Disease of Swine 9th Ed.* Blackwell Publishing.
- Bonilauri P, Guazzetti S, Barbieri G, Casali M, Franchi L, Luppi A, Calzolari M, Merialdi G, Dottori M., (2003) Longitudinal study of PRRSV infection in 6 breeding herds by ELISA-antibody test and serum pooled PCR. In: *Proc. of the 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases.* Rome, 29 June-2 July 2003, 98-99.
- Cariolet R, Blanchard P, Le Dimma M, Mahé D, Keranflec'h A, Julou P, Beaurepaire B, De Boissésou C, Troung C, Jestin A (2001) "Consequences of PCV2 experimental infection of non-immune SPF sows using the intra-uterine route". In *Proceedings of Congress on ssDNA viruses of plants, birds, pigs and primates: 2001*; Saint Malo, France, 129.

- Hansen MS, Hjulsgaard CK, Bille-Hansen V, Haugegaard S, Dupont K, Høgedal P, Kunstmann L, Larsen LE (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". *Vet Microbiol.*, 144(1-2), 203-9.
- Harding JC (2004) "The clinical expression and emergence of porcine circovirus 2". *Vet Microbiol.*, 98(2), 131-135.
- Hesse R, Kerrigan M, Rowland RR (2008) "Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field". *Virus Res.*, 132:201–207.
- Katz JB, Pedersen JC (1992) "Molecular analysis of pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild-type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms". *Biologicals* , 20:187-195.
- Kim J, Choi C, Han DU, Chae C (2001) "Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR". *Vet Rec.*, 149:304-305.
- Kim J, Ha Y, Jung K, Choi C, and Chae C (2004) "Enteritis associated with porcine circovirus 2 in pigs". *Can J Vet Res.*, 68(3): 218–221.
- Madson DM, Opriessnig T (2011) "Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) infection on reproduction: disease, vertical transmission, diagnostics and vaccination". *Anim Health Res Rev.* 12(1), 47-65.
- Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. (2009) "Reproductive failure experimentally induced in sows via artificial insemination with semen spiked with porcine circovirus type 2". *Vet Pathol.*, 46(4):707-716.
- Madson DM, Patterson AR, Ramamoorthy S, Pal N, Meng XJ, Opriessnig T. (2009a) "Effect of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of the dam on PCV2 replication in utero. *Clin and Vacc Immunol.* 16(6): 830-834.
- Morandi F, Ostanello F, Fusaro L, Bacci B, Nigrelli A, Alborali L, Dottori M, Vezzoli F, Barigazzi G, Fiorentini L, Sala V, Leotti G, Joisel F, Sarli G (2010) "Immunohistochemical detection of aetiological agents of proliferative and necrotizing pneumonia in Italian pigs." *J Comp Pathol.* 142(1), 74-78.
- Nechvatalova K, Kudlackova H, Leva L, Babickova K, Faldyna M (2011) "Transfer of humoral and cell-mediated immunity via colostrum in pigs". *Vet Immunol Immunopathol.* 142(1-2), 95-100.
- Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segales J, Domingo M (2004) "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs". *J Virol Methods*, 117(1):75-80.
- Oh Y, Seo HW, Han K, Park C, Chae C (2012) "Protective effect of the maternally derived porcine circovirus type 2 (PCV2)-specific cellular immune response in piglets by dam vaccination against PCV2 challenge." *J Gen Virol.*, 93(7), 1556-1562.
- Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG (2007) "Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies". *J Vet Diagn Invest.*, 19(6), 591-615.
- Ouardani M, Wilson L, Jetté R, Montpetit C, Dea S (1999) "Multiplex PCR for detection and typing of porcine circoviruses". *J Clin Microbiol.*, 37,3917-3924.
- Pejsak Z, Kusior G, Pomorska-Mól M, Podgórska K (2012) "Influence of long-term vaccination of a breeding herd of pigs against PCV2 on reproductive parameters". *Pol J Vet Sci.*, 15(1):37-42.
- Sarli G, Morandi F, Panarese S, Bacci B, Ferrara D, Bianco C, Fusaro L, Bacci ML, Galeati G, Dottori M, Bonilauri P, Lelli D, Leotti G, Vila T, Joisel F, Allan G, Benazzi C, Ostanello F (2012) "Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen". *Acta Vet Scand.*, 54:51

- Segalés J (2012) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis." *Virus Res.*, 164(1-2), 10-19.
- Tamanini C, Bono G, Cairoli F, Chiesa F (1985) "Endocrine responses induced in anestrus goats by the administration of different hormones after fluoregestone acetate treatment". *Anim Reprod Sci.*, 9, 357-64.
- West KH, Bystrom JM, Wojnarowicz C, Shantz N, Jacobson M, Allan GM, Haines DM, Clark EG, Krakowka S, McNeilly F, Konoby C, Martin K, Ellis JA (1999) "Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2". *J Vet Diagn Invest.*, 11(6),530-2.
- Zhai SL, Chen SN, Wei ZZ, Zhang JW, Huang L, Lin T, Yue C, Ran DL, Yuan SS, Wei WK, Long JX (2011) "Co-existence of multiple strains of porcine circovirus type 2 in the same pig from China. *Virology* 13(8):517.

IMMUNITÀ MUCOSALE SPECIFICA PER PCV2 IN SCROFE CONVENZIONALI VACCINATE E NON VACCINATE

INTESTINAL MUCOSAL PCV2-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE IN PCV2 VACCINATED AND NON-VACCINATED CONVENTIONAL GILTS

BIANCO C.¹, FELICE V.¹, PANARESE S.¹, MARROCCO R.¹,
OSTANELLO F.¹, BRUNETTI B.¹, MUSCATELLO L. V.¹, LEOTTI G.²,
VILA T.³, FRANCOIS J.³, SARLI G.¹

¹Dip. Scienze Mediche Veterinarie (DiMeVET), Bologna, Italy;

²Meril Italia SpA, Milano, Italy;³Meril S.A.S., Lyon, France

Parole chiave: suino, PCV2, immunità, vaccinazione, mucosa intestinale

Key-words: swine, PCV2, immunity, vaccination, intestinal mucosa

Riassunto

Nell'infezione da porcine circovirus 2 (PCV2) la via oro-fecale è una importante via di trasmissione, quindi la risposta immunitaria mucosale intestinale si rivela fondamentale per ridurre lo shedding. Da una precedente sperimentazione erano disponibili campioni di piccolo intestino prelevati da scrofe vaccinate (V) e non vaccinate (NV) per PCV2 e infettate con seme addizionato con PCV2. Per entrambi i gruppi (V e NV) erano disponibili campioni provenienti da 3 soggetti e prelevati a 28 e 53 giorni post-infezione (DPI). Oltre ad una metodica immunoistochimica standard per la identificazione di plasmacellule (PCs) contenenti IgA, IgG e IgM, è stata sviluppata una metodica per identificare le plasmacellule (PCs) produttrici di anticorpi anti-PCV2. Tra i 2 gruppi (V e NV) non si è registrata una variazione di PCs produttori IgG, IgA e IgM, le quali seguono una distribuzione crescente dall'apice del villo alla base delle cripte ed invece una distribuzione decrescente dal duodeno all'ileo. Nel gruppo NV non è stata registrata variazione di risposta mucosale specifica per PCV2 nel tempo: il numero di PCs è simile a 28 e a 53 DPI (rispettivamente: 10,55±4,24 e 10,06±5,01). Nel gruppo V, al contrario, è stato osservato un incremento statisticamente significativo ($P<0,05$) della risposta specifica per PCV2 nel tempo (28 DPI: 9,37±13,36; 53 DPI: 18,76±15,83). Si ipotizza che la vaccinazione migliori le condizioni di risposta mucosale intestinale verso PCV2 contenendo la viremia e lo shedding.

Summary

Oro-fecal route is important in the epidemiology of PCV2 then intestinal immune-response plays an important role for shedding. Three parts of intestine of gilts, vaccinated (V=6) or not (NV=6) against PCV2 and infected using PCV2 spiked semen were available at 2 different sampling times: 28 and 53 days post infection (DPI). An immunohistochemical investigation for IgA, IgG and IgM bearing plasma cells (PCs) was run on intestinal samples coupled to a sandwich immunohistochemical method to reveal anti PCV2 antibody secreting PCs; plasma cells density was compared in the 2 groups of animals at the 2 sampling times, 28 and 53 days post infection, n.=3 for each time in each group. The IgA, IgG and IgM PCs density did not differ between groups but displayed an increase from the upper (villus) to the lower part of the crypts and a decreasing trend in PCs density was identified from the duodenum to the ileum. In the NV group, no increase of anti PCV2 PCs density was demonstrable over time: the amounts of lamina propria PCV2-specific PCs remained constant, 10.55±4.24 and 10.06±5.01 at 28 DPI and 53 DPI, respectively.

In the V group we saw a significant increase of PCV2 PCs over time. The amounts of PCV2-specific antibody-producing plasma cells increased from 9.37 ± 13.36 at 28 DPI to 18.76 ± 15.83 at 53 DPI. We conclude that vaccination prepared animals to better react to infection through an increase of the number of mucosal specific plasma cells preventing viremia and shedding.

Introduzione

Il PCV2 ha un ruolo ormai assodato nella eziologia delle porcine circovirus diseases (PCVDs). La via oro-fecale è una importante via di trasmissione (Rose et al., 2012) in queste malattie e, per tale motivo, l'efficienza della risposta immunitaria mucosale è cruciale sia nella protezione verso l'infezione che nel contrastare l'eliminazione (shedding) virale. I compartimenti del sistema immunitario delle mucose possono essere principalmente suddivisi in: a) siti induttivi e, b) siti effettori. Nei primi vengono captati gli antigeni provenienti dalla superficie della mucosa e sovrintendono la stimolazione e l'attivazione di linfociti B e T non immuni; nei siti effettori le cellule effettrici immuni svolgono la loro azione (Brandtzaeg et al., 2008). I siti induttivi dell'immunità mucosale sono costituiti dal tessuto linfoide associato alle mucose (MALT) (Liebler-Tenorio et al., 2006), includendo, in teoria, anche i linfonodi locali/regionali drenanti la mucosa; i siti effettori sono invece costituiti da compartimenti istologicamente diversi, come la lamina propria delle varie mucose, dunque questi ultimi non dovrebbero essere inclusi nel termine MALT (Brandtzaeg, 2008). L'organizzazione del sistema immunitario a livello mucosale intestinale comprende tessuto linfoide non capsulato concentrato (placche del Peyer dell'ileo e del digiuno) (Burkey et al., 2009), che costituisce i siti induttivi di cui fa parte anche l'epitelio associato ai follicoli (Sato et al., 2005). Una componente non capsulata diffusa, che comprende cellule (linfociti, plasmacellule ma anche macrofagi, cellule dendritiche, mastociti) localizzate al di fuori delle placche del Peyer e risidenti nella lamina propria, rappresenta i siti effettori dove si avvia la risposta cellulo-mediata ed umorale (Tizard, 2009). Le plasmacellule (PCs) sono localizzate prevalentemente intorno alle cripte intestinali e costituiscono la componente secretoria del sistema mucosale adibito alla produzione di fattori umorali protettivi a livello di superficie mucosa. Per studiare l'immunità mucosale si possono valutare o quantificare le sottopopolazioni cellulari (mononucleati, neutrofili) o analizzare le molecole ad azione immunologica (citochine, immunoglobuline); non esiste una tecnica di riferimento (gold standard) per la valutazione dell'immunità secretoria. L'asse umorale mucosale può essere esaminato con le medesime tecniche adottate per i test sierologici. Un passaggio critico è il campionamento delle secrezioni, che può risentire della contaminazione ematica o sierica, dell'eccessiva diluizione o di altri contaminanti (ingesta o enzimi) (Guy, 2002). Il lavaggio della superficie mucosa può non consentire in maniera completa la raccolta delle componenti immunoglobuliniche contenute nel film mucoso che ne riveste la superficie, qualora quest'ultimo abbia elevata viscosità. In tali casi il raschiato della superficie mucosa assicura un campione più idoneo all'analisi rispetto al semplice lavaggio.

Nel lavoro vengono presentati i risultati della quantificazione, mediante analisi d'immagine, della frazione di PCs localizzate nella lamina propria di 3 tratti intestinali (duodeno, digiuno, ileo) produttori gli isotipi anticorpali IgG, IgA e IgM e di quelle secernenti immunoglobuline (Ig) anti-PCV2 nel confronto tra 2 gruppi di soggetti sperimentalmente infettati, uno vaccinato con Circovac® e l'altro non vaccinato.

Materiali e metodi

Da un precedente esperimento erano disponibili campioni di duodeno, digiuno e ileo di scrofe convenzionali vaccinate (V) con Circovac® o non vaccinate (NV) e sperimentalmente infettate con seme contenente una sospensione di PCV2. Per ogni gruppo (V e NV) erano disponibili i tessuti di 3 soggetti campionati a 28 e 53 giorni post-infezione (DPI).

	Anti IgG	Anti IgM	Anti IgA	Anti PCV2 Ig
Inibizione perossidasi endogene	3% H ₂ O ₂ in metanolo 30 min.			
Smascheramento antigenico	Pronase E 0,05%; pH 7,5; 37°C; 7 min.			Protease XIV 0,05%; 37°C; 15 min.
Sospensione virale	-----	-----	-----	10 ^{3,9} TCID ₅₀ / 25 microlitri, diluito 1:1, overnight 5±3°C
Preincubazione	PBS + 20% siero normale capra + 1% BSA		Blocking reagent (Dako)	----- -----
Anticorpo primario	Anticorpo policlonale anti IgG del suino da coniglio (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% siero normale capra; 12 ore 5±3°C	Anticorpo policlonale anti IgM del suino da coniglio (Novus Biologicals Europe); 1:40000 in PBS + 20% siero normale di capra; 12 ore 5±3°C	Anticorpo policlonale anti IgA del suino da capra (Novus Biologicals Europe); 1:4000 in PBS + 1% BSA; overnight 5±3°C	Anticorpo monoclonale F217 (Gordon Allan, Belfast, UK); 1:200 in PBS; 37°C per 2 ore
Sistema rivelatore	Sistema polimerico (Zymed ® Lab)		LSAB - perossidasi (DAKO)	Sistema polimerico (Zymed ® Lab)
Cromogeno	Diamminobenzidina 0,05%; 10 min a temperatura ambiente			
Colorazione di contrasto	Ematossilina di Papanicolau			

Tabella 1: Specifiche tecniche delle reazioni immunostochimiche per la individuazione di PCs produttrici di IgG, IgM ed IgA impiegando anticorpi policlonali rispettivamente anti isotipo G, M ed A del suino e specifiche tecniche della reazione sandwich per l'identificazione di PCs contenenti Ig specifiche per PCV2.

Table 1: Polyclonal antibodies and protocols for immunohistochemistry to swine IgG, IgM and IgA and sandwich immunohistochemical protocol for the detection of anti PCV2 antibody producing PCs.

I campioni di tessuto erano rappresentati da materiale fissato in formalina ed incluso in paraffina da cui sono state tagliate al microtomo 5 sezioni seriali di 4 μ di spessore. Una sezione è stata colorata con ematossilina-eosina, 3 sezioni, rispettivamente, per l'indagine immunistochemica con anticorpo anti-IgG, -IgA e -IgM di suino (Tabella 1). L'ultima è stata usata per la determinazione delle plasmacellule produttrici Ig specifiche per PCV2 sulla base di una tecnica proposta da Kipar et al. (1998). In specifico è stato messo a punto un metodo "sandwich" che prevedeva il pretrattamento delle sezioni con una sospensione di PCV2 seguita, dopo lavaggio, da una reazione immunistochemica diretta verso il virus per mezzo dell'anticorpo monoclonale F217 anti-PCV2. Il virus in tale modo si poneva a ponte tra la plasmacellula secernente anticorpi specifici e l'anticorpo anti-PCV2 aggiunto (Tabella 1).

Per la determinazione della specificità di reazione anti-IgG, -IgM ed -IgA è stato utilizzato, come controllo positivo, tessuto linfoide di suino normale mentre come controllo negativo l'anticorpo primario era sostituito da un altro di irrilevante specificità. Per la stessa finalità, nella reazione sandwich tesa ad identificare le PCs contenenti Ig specifiche per PCV2, o veniva sostituito l'anticorpo primario con altro di irrilevante specificità o veniva omesso il passaggio di pretrattamento delle sezioni con la sospensione virale.

L'analisi quantitativa delle PCs è stata condotta secondo il metodo di Waly et al. (2001), valutando separatamente i conteggi eseguiti nei 3 strati o aree anatomico-funzionali della lamina propria intestinale: 1) lamina propria a livello del villo, 2) lamina propria a livello della parte superiore e 3) della parte inferiore della cripta (Figura 1). Per ogni area venivano acquisite da 3 a 6 immagini ed in ognuna la lamina propria è stata selezionata, misurata e la quantità di PCs contate. La densità di PCs nella lamina propria è espressa come numero di cellule/10000 μ^2 .

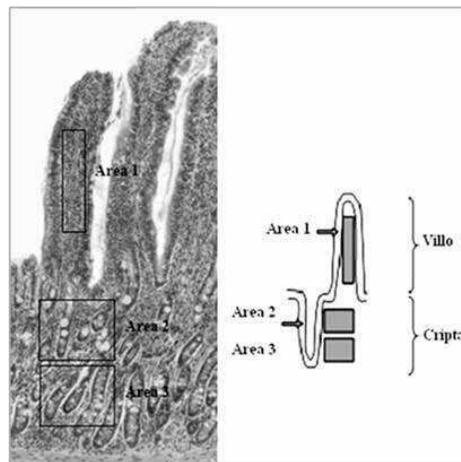


Figura 1. Rappresentazione delle 3 aree morfofunzionali della lamina propria in cui i conteggi delle PCs sono stati eseguiti: area 1 (lamina propria del villo); area 2 (lamina propria della parte superiore della cripta); area 3 (lamina propria della parte inferiore della cripta). Sulla destra lo schema proposto da Waly et al., 2001.

Figure 1. Schematic diagram of the 3 lamina propria areas used for the cell count: area 1 (lamina propria of the villus); area 2 (lamina propria of the upper part of the crypt); area 3 (lamina propria of the deep part of the crypt). On the right, the reference areas proposed by Waly et al., 2001.

In via preliminare, la normalità della distribuzione campionaria dei conteggi effettuati è stata verificata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov (K-S). Sulla base dei risultati di questo test, i successivi confronti sono stati condotti utilizzando i test *t* di Student, Mann-Whitney (M-W) o Kruskal-Wallis (K-W).

Risultati

Tutti i campioni esaminati erano esenti da patologia. Le PCs positive alla reazione immunostochimica presentavano colorazione marrone nel citoplasma. Una reazione immunostochimica specifica si rilevava anche, in particolare per IgA ed IgM, a livello del bordo luminale dell'epitelio delle cripte (Figura 2). Le PCs contenenti IgA sono state le più numerose, seguite da quelle contenenti IgG ed infine da con IgM. Considerando l'insieme delle 3 aree di lamina propria (area 1, 2 e 3) la quantità di PCs contenenti IgM, IgG o IgA non differiva tra i 2 gruppi a confronto (V vs NV); tuttavia, è stato costantemente osservato un significativo aumento del numero di PCs dall'area 1 (villo) all'area 3 (parte inferiore della cripta), c.d. gradiente verticale crescente. Inoltre è stato osservato, sempre per tutti gli isotipi ed in entrambi i gruppi, un decremento del numero di PCs dal duodeno all'ileo (c.d. gradiente orizzontale decrescente) (Figura 3). Con la metodica sandwich, utilizzata per identificare le PCs contenenti Ig specifiche per PCV2, si riscontrava una positività citoplasmatica non solo nelle plasmacellule (Figura 2) ma anche nei macrofagi interstiziali, in cellule endoteliali e nel bordo luminale dell'epitelio di alcune cripte. La reazione immunostochimica è stata considerata specifica in quanto la positività citoplasmatica era assente omettendo il passaggio della sospensione virale o sostituendo l'anticorpo primario. I conteggi sono comunque stati condotti includendo solo le plasmacellule positive. La distribuzione di PCs contenenti Ig specifiche per PCV2 manteneva il gradiente verticale ed orizzontale registrato per le PCs contenenti i diversi isotipi immunoglobulinici (Figura 3). Nei gruppi V e NV è stato osservato un profilo significativamente diverso nella quantità di PCs PCV2 specifiche fra i 2 diversi tempi di campionamento. Nel gruppo NV non è stata registrata nessuna variazione statisticamente significativa ($P=0.76$) di risposta mucosale nel tempo, il numero di PCs è rimasto invariato da 28 (media \pm dev. standard: $10,55\pm 4,24$) a 53 ($10,06\pm 5,01$) DPI. Nel gruppo V si è invece registrato un significativo incremento ($P=0,037$) di risposta specifica per PCV2 passando da 28 ($9,37\pm 13,36$) a 53 ($18,76\pm 15,83$) DPI (Figura 4).

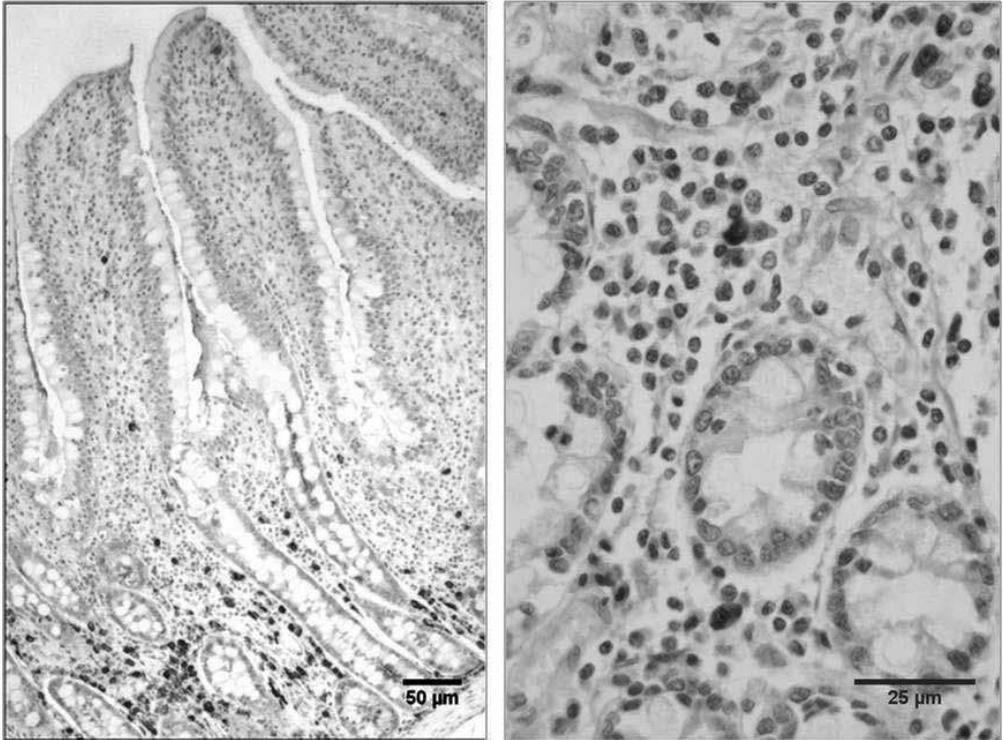


Figura 2. A sinistra: Suino. Intestino. Ileo. La foto mostra plasmacellule positive (citoplasma marrone) per IgA. E' presente positività anche del versante apicale delle cripte. Reazione immunoistochimica con anticorpo anti-IgA del suino (10x).

A destra: Suino. Intestino. Ileo. La foto mostra plasmacellule positive alla reazione sandwich (colore marrone del citoplasma) contenenti immununoglobuline anti-PCV2. Sono presenti anche plasmacellule negative (citoplasma azzurro). Reazione immunoistochimica con la tecnica sandwich (40x).

Figure 2. Left: Pig. Gut. Ileum. Immunohistochemical staining to swine IgA showing positive plasma cells (cytoplasm brown stained) and the apical staining of the crypts. Immunohistochemistry to swine IgA (10x).

Right: Pig. Gut. Ileum. Immunohistochemical staining showing PCs containing anti-PCV2 immunoglobulins (cytoplasm brown stained). PCs negative are also present in the field (40x).

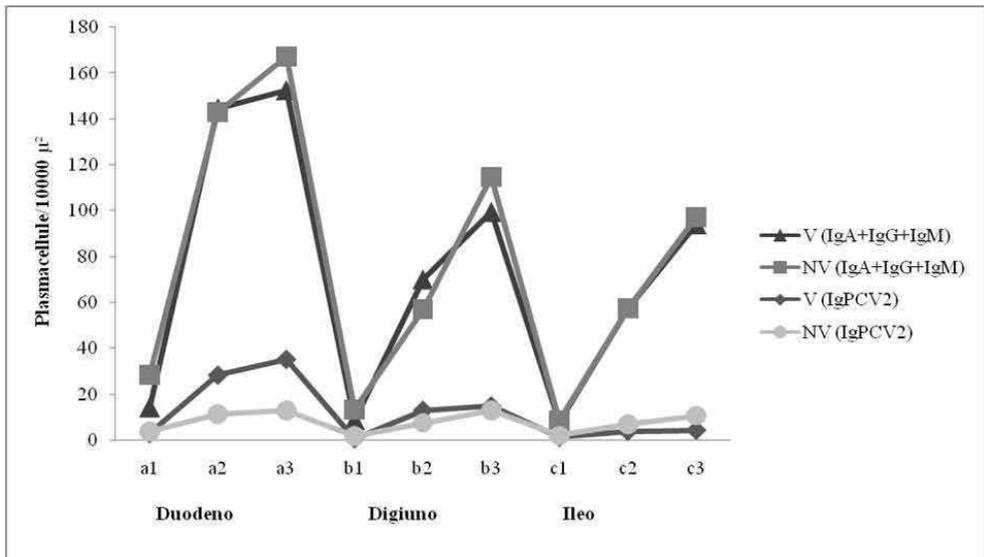


Figura 3: Gradiente verticale ed orizzontale dei valori medi di plasmacellule secernenti IgA+IgM+IgG e anticorpi specifici antiPCV2/10000 micron quadri di lamina propria per tratto intestinale, per gruppo (V e NV). Duodeno: a1= lamina propria (lp) villo; a2= lp parte superiore cripta; a3= lp parte inferiore cripta; digiuno: b1= lp villo; b2= lp parte superiore cripta; b3= lp parte inferiore cripta; ileo: c1= lp villo; c2= lp parte superiore cripta; c3= lp parte inferiore cripta.

Figure 3: Vertical and horizontal trends in each group (V=vaccinated ; NV=not vaccinated) of the mean IgA+IgM+IgG and anti PCV2 plasma cell density/10000 square micron of lamina propria. Duodenum: a1= villus lamina propria (lp); a2= cripta upper part lp ; a3= cripta lower part lp ; Jejunim: b1= villus lp; b2= cripta upper part lp ; b3= cripta lower part lp; ileum: c1= villus lp; c2= cripta upper part lp ; c3= cripta lower part lp.

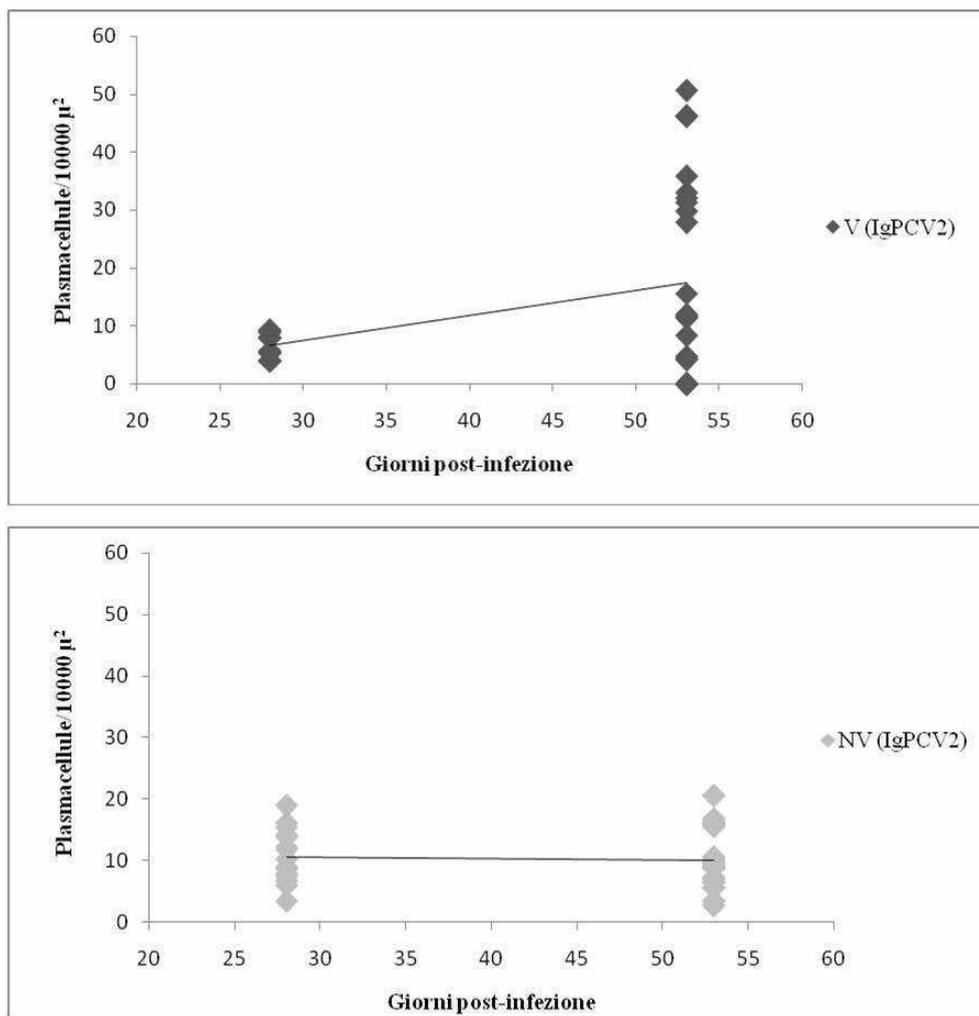


Figura 4. Confronto della densità delle plasmacellule contenenti anticorpi anti-PCV2 nella lamina propria dell'intestino tra i due gruppi V e NV in due successivi momenti di campionamento. Si rileva un aumento significativo del numero di plasmacellule specifiche nel gruppo V nel tempo.

Figure 4. Comparison between V and NV groups in 2 consecutive sampling times of the density of PCs producing PCV2-specific antibodies in the lamina propria. In the V group a significant increase of anti-PCV2 antibody bearing PCs is present over time.

Discussione

Il presente studio riporta informazioni relative alla distribuzione di PCs secernenti IgA, IgM e IgG nella lamina propria intestinale di suino, con particolare riferimento alla distribuzione delle cellule Ig-secernenti nella mucosa intestinale lungo l'asse villo-cripta (gradiente verticale) e dal duodeno all'ileo (gradiente orizzontale), nonché la predominanza delle IgA rispetto agli

altri due isotipi. I risultati ottenuti confermano quelli riportati in letteratura (Allen et al., 1973; Allen et al., 1977) che avevano esaminato mediante immunofluorescenza la mucosa intestinale di suini di 3 mesi senza dividerla in aree. Occorre tuttavia puntualizzare che la distribuzione da noi osservata è “tendenzialmente” simile a quanto rilevato da Allen et al. (1973; 1977) ma non uguale, probabilmente a causa della diversa impostazione dei lavori. Le informazioni disponibili in letteratura indicano che le plasmacellule della mucosa intestinale sono in maggioranza quelle contenenti IgA, IgM e solo poche sono quelle a contenuto di IgG (Stokes et al., 2000). A 4 settimane di vita, le IgM sono frequenti tanto quanto le IgA (Bianchi et al., 1999) ma, queste ultime superano in numero le IgM a partire da 12 settimane d’età (Allen et al., 1977; Bianchi et al., 1999), raggiungendo circa il 90% delle plasmacellule totali (Allen et al., 1977), mediante commutazione (c.d. shift isotipico) da IgM a IgA (Bianchi et al., 1999).

Complessivamente i dati ottenuti nel presente studio circa il gradiente verticale ed orizzontale delle PCs confermano quanto noto, e cioè che la distribuzione di PCs non è uniforme lungo i tratti del piccolo intestino (duodeno, digiuno, ileo) (Allen et al., 1973): nella lamina propria del duodeno è concentrato il maggior numero di cellule immunoglobulinose secernenti, circa 10 volte la quantità presente nel digiuno (Allen et al., 1973), indipendentemente dalla classe di immunoglobuline (Allen et al., 1973; Allen et al., 1977). Al contrario, il minor numero di esse è contenuto nella lamina propria dell’ileo e corrisponde circa alla metà delle cellule immunoglobulinose secernenti presenti nel digiuno. La distribuzione non è omogenea anche lungo l’asse villo-crypta: in suinetti lattanti è stato rilevato che sia le IgA sia le IgM sono molto più numerose nella lamina propria che circonda la cripta, mentre poche sono presenti a livello del villo (Allen et al., 1973).

L’originalità del presente lavoro è rappresentata dalla messa a punto della metodica ideata da Kipar et al. (1998), che aveva dimostrato la presenza di plasmacellule produttrici immunoglobuline specifiche verso il coronavirus felino nelle lesioni granulomatose della peritonite infettiva felina (FIP), suggerendo l’uso di una metodica sandwich che prevedesse l’utilizzo di una sospensione virale da far precedere ad una reazione immunoistochimica diretta verso il virus. La nostra finalità nella messa a punto del metodo era prevalentemente indirizzata a verificare un eventuale effetto del vaccino nel modificare la quantità di PCs contenenti immunoglobuline specifiche per PCV2. La metodica si è rivelata specifica in quanto la colorazione era assente con l’omissione della sospensione virale o con l’omissione dell’anticorpo primario anti-PCV2.

La presenza di PCs produttrici di Ig specifiche per PCV2 può essere la risposta locale alla presenza di PCV2 ma potrebbe rappresentare anche parte di una risposta sistemica: la vaccinazione potrebbe aver reclutato sottopopolazioni di linfociti destinati all’homio - per “homio” s’intende: l’arrivo di un linfocita, comunemente dal circolo sanguigno, in un organo linfatico o non linfatico (Bimczok et al., 2006) - mucosale intestinale. Infatti, è stato dimostrato che la secrezione di anticorpi a livello di mucosa può essere indotta da vaccini somministrati per via parenterale (Bouvet et al., 2002). Poichè, nel corso della sperimentazione durante la quale sono stati prelevati i tratti di intestino esaminati nella presente indagine, si erano registrati, a parità di condizione immunitaria nel momento della fecondazione con seme infetto, una frequenza di viremia e shedding virale significativamente inferiore nel gruppo dei soggetti V rispetto a quelli NV, ci siamo posti il problema di indagare la risposta mucosale intestinale come elemento eventualmente influenzabile dalla vaccinazione e in grado di prevenire o ridurre la viremia e lo shedding virale.

Tenendo conto delle già citate criticità dell’indagine dell’immunità mucosale secretoria, la tecnica proposta si mostra oggettiva. Inoltre, essendo una tecnica quantitativa fornisce dati confrontabili con altri parametri siero-epidemiologici (viremia, shedding). Dai dati

ottenuti nei soggetti vaccinati si è osservata la capacità, dopo infezione e nel tempo, di modulare positivamente la quantità di PCs produttrici di Ig verso PCV2. Verosimilmente questa capacità di potenziare la difesa di mucosa, in una malattia a ciclo oro-fecale, è uno dei fenomeni biologico che contribuiscono a spiegare la minor frequenza di viremia e la riduzione dello shedding virale riscontrato nei soggetti vaccinati.

Conclusioni

La metodologia proposta per l'analisi d'immagine tesa a quantificare le PCs nella lamina propria dell'intestino ed i risultati ottenuti dalla quantificazione delle PCs producenti isotipi immunoglobulinici IgA, IgM e IgG possono essere considerati dati di riferimento in un intestino di suino morfologicamente normale ed essere quindi la base futura per il confronto con situazioni patologiche. Il metodo sandwich può essere proposto come metodica di affiancamento o alternativa ad altre oggi in uso per la stima dell'immunità umorale mucosale. Da sottolineare, seppure registrato su soggetti diversi del gruppo V, l'effetto "booster-like" del vaccino che, a livello di mucosa intestinale, induce, in due momenti successivi post infezione, un incremento significativo del numero di PCs producenti Ig specifiche per PCV2.

Bibliografia

Allen W.D., Porter P. (1973) "The relative distribution of IgM and IgA cells in intestinal mucosa and lymphoid tissues of the young unweaned pig and their significance in ontogenesis of secretory immunity". *Immunology* 24 (3), 493-501.

Allen W.D., Porter P. (1977) "The relative frequencies and distributions of immunoglobulin-bearing cells in the intestinal mucosa of neonatal and weaned pigs and their significance in the development of secretory immunity". *Immunology* 32 (5), 819-824.

Bianchi A.T.J., Scholten J., MoonenLeusen B.H.W.M., Boersma W.J.A. (1999) "Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing". *Dev Comp Immunol.* 23 (6), 511-520.

Bimczok D., Rothkötter H.J. (2006) "Lymphocyte migration studies." *Vet Res.* 37, 325-338.

Bouvet J-P, Decroix N., Pamonsinlapatham P. (2002) "Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination?" *Trends Immunol.* 23 (4), 209-213.

Brandtzaeg P., Kiyono H., Pabst R., Russel M.W. (2008) "Terminology: nomenclature of mucosa-associated lymphoid tissue". *Mucosal Immunol.* 1 (1), 31-37.

Burkey T.E., Skjolaas K.A., Minton J.E. (2009) "Board invited review: porcine mucosal immunity of the gastrointestinal tract". *J Anim Sci.* 87 (4), 1493-1501.

Guy B. (2002) "Evaluation of events occurring at mucosal surfaces: techniques used to collect and analyze mucosal secretion and cells". *Clin Diagn Lab Immunol.* 9 (4), 753-762.

Kipar A., Bellmann S., Kremendahl J., Köhler K., Reinacher M. (1998) "Cellular composition, coronavirus antigen expression and production of specific antibodies in lesions in feline infectious peritonitis". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65 (2-4), 243-257.

Liebler-Tenorio E.M., Pabst R. (2006) "MALT structure and function in farm animals". *Vet Res.* 37 (3), 257-280.

Rose N., Opriessing T., Grasland B., Jestin A. (2012) "Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2)". *Virus Res.* 164(1-2), 78-89.

Sato A., Iwasaki A. (2005) "Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity". *Cell Mol Life Sci.* 62(12), 1333-1338.

Stokes C.R., Bailey M. (2000) "The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation?" *J Biotechnol.* 83 (1-2), 51-55.

Tizard Ian R. (2009) "Veterinary Immunology: an introduction", 8a ed., St Louis, Missouri, Saunders Elsevier.

Waly N., Gruffydd-Jones T.J., Stokes C.R., Day M.J. (2001) "The distribution of leucocyte subsets in the small intestine of healthy cats". *J Comp Pathol.* 124 (2-3), 172-182.

STUDIO DEL FENOMENO DELLA RICOMBINAZIONE TRA STIPITI DI PRRSV CIRCOLANTI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA.

STUDY OF PRRSV RECOMBINATION AMONG STRAINS CIRCULATING IN HERDS FROM NORTHERN ITALY

DRIGO M.¹, FRANZO G.¹, CEGLIE L.², GIGLI A.², MARCO MARTINI¹.

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi di Padova;

²Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe), 35020 Legnaro, Italy.

Parole chiave: PRRSV, Italia, ricombinazione, ORF5, ORF7.

Keywords: PRRSV, Italy, recombination ORF5, ORF7.

RIASSUNTO

La ricombinazione tra differenti stipiti del virus della PRRSV è stata riportata sia *in vitro* sia *in vivo*. Ciononostante evidenze di ricombinazione da studi di campo sono rare e principalmente ottenute dalla comparazione di sequenze da campionamenti su larga scala. Questo studio è rivolto ad indagare questo fenomeno su piccola scala usando 162 campioni ottenuti da suini di allevamenti di tre regioni del Nord Italia e raccolti tra il 2009 e il 2012.

L'analisi di ricombinazione è stata condotta su ORF5, ORF7 e loro concatenazione tramite il programma RDP3. È stata eseguita la predizione *in silico* degli epitopi target della GP5 degli stipiti ricombinanti più significativi. La storia filogeografica dei pattern di migrazione degli stipiti di PRRSV, considerando la provincia come livello minimo, è stata ricostruita usando l'approccio bayesiano implementato in BEAST. In totale sono state ottenute le sequenze di 114 ORF5, 84 ORF7 e 50 sequenze concatenate. È stata evidente la predizione di tre eventi di ricombinazione. Due mostravano almeno un *breakpoint* nella regione non sequenziata tra ORF5 e ORF7, il terzo evento comprendeva la regione di ORF5 includendo parte del maggiore epitopo di neutralizzazione. L'identificazione a distanza di tempo degli stessi stipiti ricombinanti nella medesima azienda depone a favore di una loro significativa *fitness*. L'analisi filogeografica ha rivelato alcuni tassi di migrazione adeguatamente supportati da significatività statistica.

ABSTRACT

Recombination of different PRRSV strains has been reported both *in vitro* and *in vivo*. However field evidences of recombination are rare and mainly obtained comparing sequences from large-scale sampling. This work aimed to investigate this phenomenon on a smaller scale using 162 samples originating from three regions of northern Italy, collected during 2009-2012. Recombination analysis was performed using RDP3 on ORF5, ORF7 and their concatenation. GP5 structure, T and B cell epitopes of the most significant recombinant strains were predicted *in silico*. Phylogeographic history of migration patterns of PRRSV strains was inferred using the Bayesian framework implemented in BEAST. A total of 114 ORF5, 84 ORF7 and 50 concatenated sequences were obtained. Three recombination events were strongly supported. Two showed at least one breakpoint in the non-sequenced region between ORF5 and ORF7. Another recombination event spanned a region within ORF5 including part of the major neutralizing epitope. Since major and minor parents and recombinant strains

were sampled at different time points in the same farm, co-circulation and a certain fitness of recombinant virus were demonstrated. Phylogeography reveals several strongly supported migration rates among provinces.

INTRODUZIONE

Fin dalla sua prima comparsa la Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) è emersa come la malattia di maggior impatto economico per la suinicoltura mondiale. Una grandissima variabilità genetica è stata dimostrata tra gli stipiti circolanti all'interno dei due genotipi principali (Tipo 1 e Tipo 2) che condividono solo il 50-70% dei nucleotidi e il 50-80% degli aminoacidi (6). Inoltre la diversità nucleotidica media all'interno del Genotipo Tipo 1 e del Genotipo Tipo 2 è stata stimata in circa il 15% e 12,5% rispettivamente (6) e probabilmente in progressivo aumento.

Nonostante il ruolo della ricombinazione nell'evoluzione dei virus ad RNA sia ancora dibattuto, alcuni autori asseriscono che la ricombinazione sia un importante meccanismo nel contribuire alla diversità genetica di PRRSV (3) giocando un ruolo nella patogenesi, nella evasione dalla risposta immunitaria e nell'insuccesso diagnostico. Alcuni studi hanno dimostrato eventi di ricombinazione sia *in vitro* sia *in vivo*, in condizioni sia sperimentali sia di campo (1, 6). In quest'ultimo caso le evidenze sono tipicamente ottenute da studi su larga scala, mentre lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare il fenomeno della ricombinazione su scala spaziale e temporale ristretta.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 162 campioni (siero e polmoni) provenienti da tre regioni dell'Italia settentrionale e risultati positivi per PRRSV durante la normale attività diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie nel periodo 2009-2012. Tutti i campioni sono stati testati usando una RT-PCR. ORF5 e ORF7 dei campioni positivi sono stati amplificati usando una RT-PCR *one step* come descritto da Oleksiewicz et al. (4). Gli ampliconi sono stati sequenziati con gli stessi primer, in entrambi i sensi, usando il kit di sequenziamento Big Dye terminator v.3.1. I cromatogrammi sono stati ottenuti usando ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer e il consenso delle sequenze mediante l'uso di ChromasPRO (versione 1.5). L'allineamento delle sequenze ottenute, assieme a quelle derivate dal lavoro di Pesente et al. (5), è stato realizzato e valutato usando il metodo MAFFT implementato nel programma Guidance.

Gli allineamenti di ORF5, ORF7 e delle sequenze concatenate sono stati testati per eventi di ricombinazione usando il programma RDP3. Al fine di ottenere una stima conservativa, è stato accettato un evento di ricombinazione solo quando evidenziato da almeno tre metodi implementati nel programma d'analisi. La significatività statistica dell'incongruenza topologica dovuta alla ricombinazione è stata valutata mediante i test SH, KH, ELW e AU implementati nei programmi TREEPUZZLE and CONSEL. In tutte le analisi la soglia di significatività statistica è stata posta a valori di $P=0.05$.

Sono state valutate le conseguenze strutturali della ricombinazione. La *p-distance* amminoacidica degli stipiti ricombinanti rispetto ai loro parentali è stata calcolata usando MEGA5. I siti di glicosilazione *N-linked* e la topologia transmembrana della GP5 sono stati predetti usando il server NetNGlyc 1.0 e Psipred, rispettivamente. È stato valutato il possibile ruolo della pressione immunitaria mediante predizione *in silico* degli epitopi per le cellule T. I ligandi coinvolti nelle risposte dei linfociti T citotossici sono stati stimati mediante il software NetCTLpan 1.1. Tutti gli alleli degli SLA (*Swine Leukocytes Antigen*) di classe I depositati nel database del programma sono stati utilizzati per predire i peptidi tra gli 8 e gli 11 AA di lunghezza. I ligandi del MHC II invece sono stati ottenuti usando il server

NetMHCII e cercando i peptidi di 15 AA di lunghezza che contenessero la raccolta degli HLA (*Human Leukocytes Antigen*) di classe II. Per limitare la presenza di risultati falsamente positivi i peptidi sono stati considerati come possibili epitopi quando compresi nel rank 1% e con una IC50nM<50. Il programma BEAST è stato utilizzato per ottenere la ricostruzione filogeografica dei pattern di migrazione tra stipiti di PRRSV tra alcune province del nord Italia, utilizzando le sequenze disponibili, non ricombinanti, ORF5-ORF7 concatenate e di cui erano noti i dati di campionamento. È stato calcolato il Fattore Bayesiano (BF) al fine di definire i tassi di diffusione ben supportati (BF>5) usando il programma SPREAD.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale si sono ottenute 114 ORF5, 84 ORF7 e 50 sequenze concatenate, includendo quelle derivate dal lavoro di Pesente et al. (5). L'analisi di ricombinazione ha rivelato 3 eventi di ricombinazione (Figura 1).

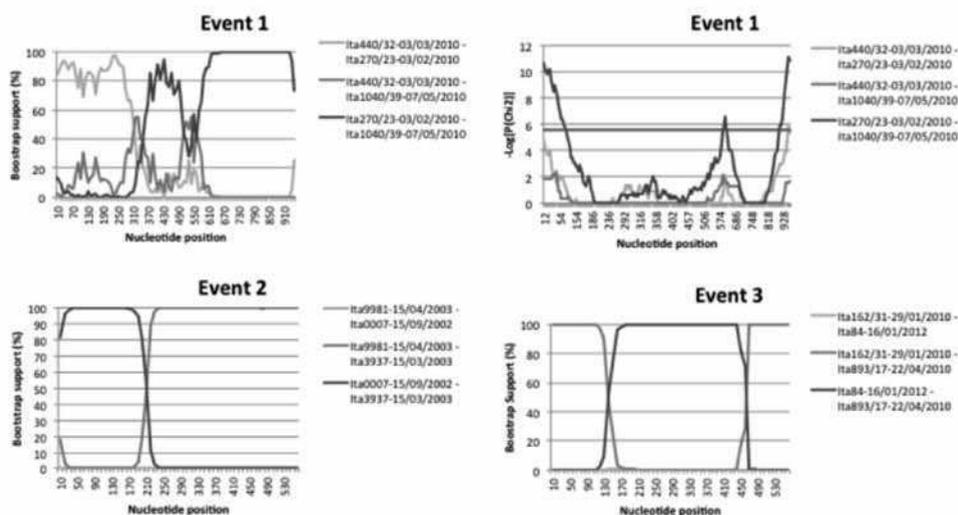


Figura 1. Evidenze di ricombinazione ottenute usando il programma RDP3.

la relazione filogenetica tra gli stipiti viene valutata tramite il supporto di bootstrap assunto come un indice della forza di questa relazione; di conseguenza un cambiamento significativo nel valore di bootstrap è suggestivo di ricombinazione. Per il primo evento, date le minori evidenze ottenute con la bootscaan analisi, viene riportato anche l'output del MaxChi, metodo particolarmente vocato alla evidenziazione dei breakpoint.

Figure 1. Recombination evidences using RDP3 programme.

Phylogenetic analysis evaluated through bootstrap support assumed as an index of the relatedness between strains; a change in the bootstrap support is suggestive of recombination. For the first event also the MaxChi output is also displayed (this programme is particularly oriented in finding breakpoint) since evidence provided by bootscaan analysis were less evident.

Il primo evento di ricombinazione dimostrava un singolo *breakpoint* tra la fine di ORF5 e l'inizio di ORF7 (sequenza Ita1040/39-07/05/2010). Sfortunatamente la sequenza compresa tra questi due segmenti non è stata sequenziata e non è stata pertanto possibile una più precisa collocazione (Figura 2).

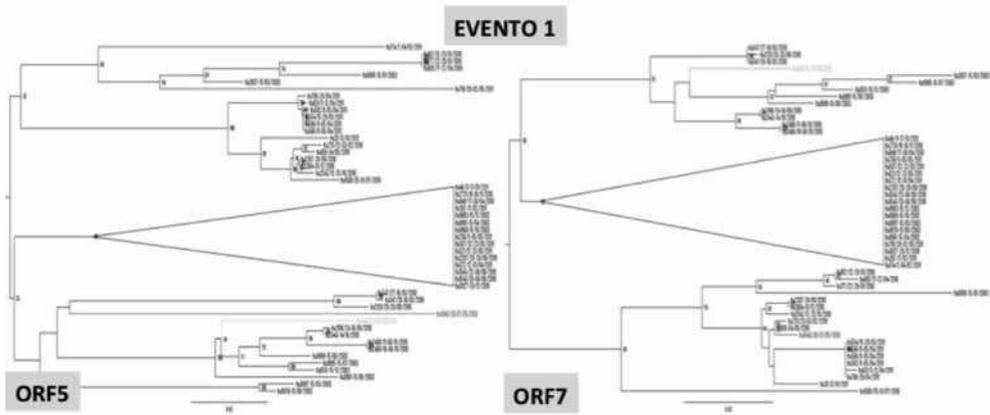


Figura 2. Evento 1: relazioni filogenetiche tra stiptipi ottenute a partire dalle sequenze dell'ORF5 e dell'ORF7.

Figure 2. Event 1: phylogenetic relationship among strains derived from ORF5 and ORF7 sequences.

Del secondo evento di ricombinazione, sempre riscontrato tra ORF5 e ORF7, (sequenza Ita3937-15/03/2003), è stato possibile identificare chiaramente solo un parentale. Un'analisi più completa, utilizzando un dataset più ampio di tutti gli ORF5 disponibili, ha confermato la presenza di ricombinazione nella regione compresa tra 211 e 606 e identifica le sequenze Ita9981-15/04/2003 e Ita0007-15/09/2002 come parentali minore e maggiore. Il terzo evento di ricombinazione comprendeva la regione dell'ORF5 tra i nucleotidi 123 e 462, identificando le sequenze Ita177/22-29/01/2010, Ita893/17-22/04/2010 e Ita162/32-29/01/2010 come ricombinanti (Figura 3).

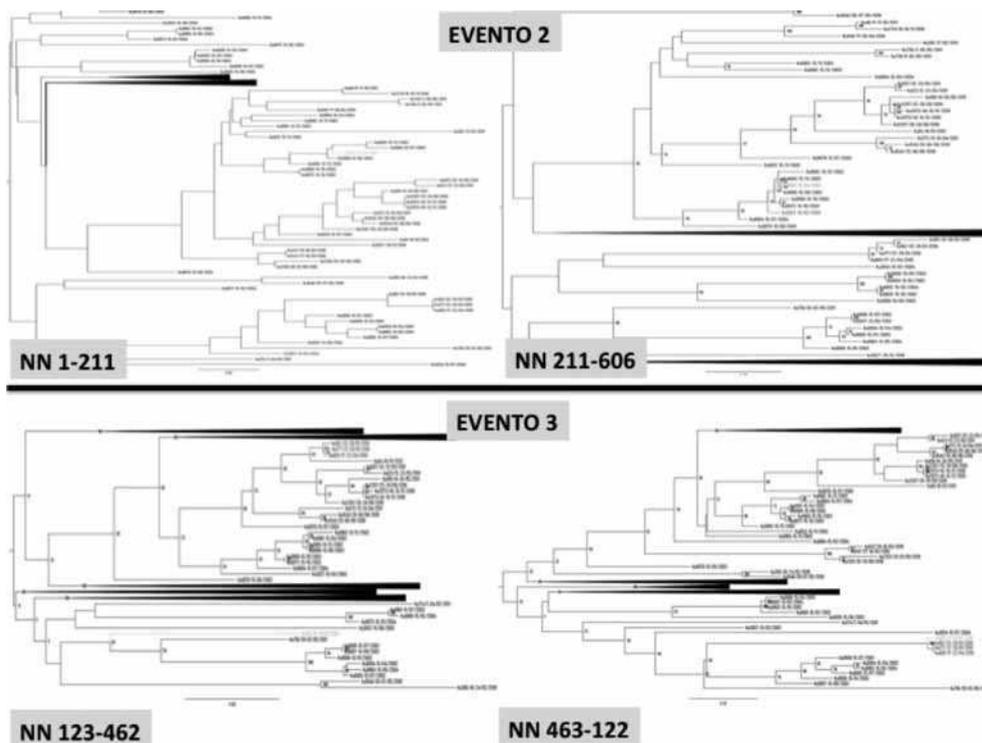


Figura 3. Evento 2-3: relazioni filogenetiche tra stipiti ottenute a partire dalle sequenze nella regione compresa ed esterna ai breakpoint di ricombinazione.

Figure 3. Event 2-3: phylogenetic relationship among strains reconstructed from segment internal and external to recombination breakpoints.

Le sequenze Ita84-16/01/2012 e Ita162/31-29/01/2010 sono state identificate rispettivamente come parentale minore e maggiore. È di notevole interesse che tutti questi campioni, raccolti in momenti temporali diversi, siano originati dallo stesso allevamento dimostrando una prolungata co-circolazione di stipiti parentali e ricombinanti. Infatti, gli stipiti ricombinanti sono stati campionati due volte a circa tre mesi di distanza, dimostrando quindi anche una certa *fitness* di questo nuovo virus. Il calcolo della *p-distance* ha dimostrato una rilevante differenza aminoacidica tra i rispettivi parentali: circa un 15% nella regione interna ai *breakpoint* (AA 41-154) e circa un 26% in quella esterna.

Al fine di evidenziare le possibili rilevanti differenze strutturali, è stata eseguita la predizione delle regioni transmembrana, senza che però venisse dimostrata una differenza nella GP5 tra parentali e ricombinanti. Sebbene parte dell'epitopo neutralizzante (AA 37-44) (2) fosse incluso in questo segmento, solamente una mutazione aminoacidica influenzata dalla ricombinazione era identificabile (AA 37). L'AA 41 era differente sia negli stipiti parentali che in quelli ricombinanti, questi ultimi caratterizzati dalla condivisione dello stesso residuo aminoacidico. Sono state osservate delle differenze rispetto ai pattern di glicosilazione: per

gli stipiti 162/31, 893/32 e 162/32 la glicosilazione è stata predetta in posizione 36, 46 e 53 rispettivamente. Un simile pattern è stato predetto per lo stipite 84 con la sola differenza che la N-glicosilazione era presente in posizione 37 invece che 36. Una certa differenza è stata evidenziata invece nello stipite 177/22 in cui era stata persa la glicosilazione in posizione 46 (Tabella 1).

Tabella 1. Profili di glicosilazione degli stipiti parentali e dei tre ricombinanti identificati nell'evento 3.

Table 1. Glycosylation profiles of parental and recombinant strains identified in the event 3.

POSITION	Ita162/31-29/01/2010 ^a	Ita893/17-22/04/2010 ^b	Ita162/32-29/01/2010 ^b	Ita177/22-29/01/2010 ^b	Ita84-16/01/2012 ^c
36	X	X	X	X	
37					X
46	X	X	X		X
53	X	X	X	X	X

^aParentale maggiore; Major parent;

^bStipiti ricombinanti; recombinant strains;

^cParentale minore; Minor parent.

L'analisi degli epitopi riconosciuti dalle cellule T, ha evidenziato che tra i parentali sono riconosciuti più o meno gli stessi epitopi e che sono coinvolti gli stessi alleli del MHC, con solamente alcune eccezioni.

Ad ogni modo deve essere sottolineato che i metodi di analisi *in silico* forniscono solo una stima probabilistica della struttura reale degli epitopi cellulari e che per i ligandi del MHC II è stata testata solo una selezione degli HLA, rendendo i risultati probabilmente meno rappresentativi. Sebbene sembrino essere presenti solo minori differenze, il ruolo della ricombinazione nel condizionare la risposta umorale e cellulo mediata non può essere escluso. Infatti, la risposta umorale può essere dipendente non solo dalla sequenza dell'epitopo neutralizzante o del sito di glicosilazione, ma anche dai cambiamenti conformazionali che impediscono l'interazione tra l'epitopo di neutralizzazione e gli anticorpi neutralizzanti (2). Inoltre non può essere escluso che nuove combinazioni di epitopi cellulari contribuiscano a differenti pressioni immunologiche, giocando un ruolo quindi nel condizionare la *fitness* di stipiti ricombinanti. In questo studio una frequenza relativamente alta di eventi di ricombinazione è stata osservata, soprattutto confrontando la ristretta area geografica considerata rispetto a quella di altri studi dove solo uno o al massimo pochi ricombinanti sono stati trovati (6). Alcune considerazioni possono essere fatte a tal riguardo: i) raccogliendo numerosi campioni da un'area piccola e in un ristretto periodo, è più probabile che siano campionati stipiti ricombinanti con bassa *fitness*, la cui sopravvivenza e diffusione tra allevamenti è improbabile; ii) le sequenze analizzate in questo studio, erano piuttosto simili (*p-distance* media: ORF5=0.133, ORF7=0.097 concatenate=0.121) facilitando la ricombinazione come descritto anche da Van Vugt et al. (7); iii) L'analisi filogeografica ha rivelato un tasso di migrazione tra province statisticamente ben supportato in 15 casi; considerato che, per

avere ricombinazione, la stessa cellula deve essere infettata da due differenti stipiti virali, la trasmissione di stipiti differenti tra allevamenti rende più probabile questo fenomeno. L'analisi filogeografica suggerisce quindi che all'interno della suinicoltura del nord Italia esiste un'ampia circolazione di molteplici stipiti di PRRSV e che le misure di biosicurezza atte a minimizzare la trasmissione e l'entrata di nuovi stipiti in un allevamento non sono efficaci, facilitando in questo modo la ricombinazione.

CONCLUSIONI

Questo studio retrospettivo ha dimostrato la presenza di un numero relativamente alto di eventi di ricombinazione all'interno di una limitata area di studio e in un breve arco temporale. Altri esempi della letteratura, riferiti a campionamenti su larga scala, suggeriscono che la ricombinazione possa essere di per se un fenomeno relativamente frequente ma che raramente gli stipiti ricombinanti acquisiscono un vantaggio evolutivo tale da permettere loro di sopravvivere per lungo tempo e quindi di diffondersi (6). Fattori manageriali, epidemiologici e genetici, peculiari della filiera suinicola dell'area geografica considerata, possono contribuire a rendere più probabile questo fenomeno. Inoltre è stata dimostrata la prolungata co-circolazione di virus ricombinanti e parentali in un allevamento. Non vi sono ancora evidenze conclusive che suggeriscano un ruolo della selezione immunitaria nel determinare la *fitness* virale. Il follow up dell'evoluzione epidemiologica, clinica e genetica in questo allevamento per un periodo più lungo permetterà di ottenere una visione più approfondita sulle possibili conseguenze della ricombinazione e sulla sua spinta evolutiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Franzo, G., Ceglie, L., Gigli, A., Martini, M., Drigo, M. (2012) "Evidence of Prrsv recombination from field samples in northeastern Italy". EUROPRRS2012 - Understanding and combating PRRS in Europe. :78-84.
- 2) Mateu E., Diaz I. (2008) "The challenge of PRRS immunology". Veterinary Journal 177: 345-51.
- 3) Murtaugh MP., Stadejek T., Abrahante JE., Lam TT., Leung FC. (2010) "The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Virus Res 154: 18-30.
- 4) Oleksiewicz MB., Bøtner A., Madsen KG., 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.
- 5) Pesente P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Ruffoni LS., Torriani S. (2006). "Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management". Vet Microbiol 114: 214-224.
- 6) Shi M., Lam TT., Hon CC., Hui RK., Faaberg KS., Wennblom T., Murtaugh MP., Stadejek T., Leung FC. (2010) "Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective". Virus research 154: 7-17.
- 7) van Vugt J., Storgaard T., Oleksiewicz MB., Bøtner A. (2001) "High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity". J Gen Virol 82: 2615-20.

PESTE SUINA CLASSICA (PSC) E BIOSICUREZZA: CATEGORIZZAZIONE DEL RISCHIO NEGLI ALLEVAMENTI DI SUINI IN SERBIA

CLASSIC SWINE FEVER (CSF) AND BIOSECURITY: RISK ASSESSMENT IN PIG HOLDINGS IN SERBIA

SENSI M.¹, IVANOV Y.², PLAUSIC B.³

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

²Project Leader – “Technical Assistance for Control and Eradication of CSF and Rabies in Serbia” - OPERA scarl

³Head of Animal Health, Welfare and Traceability Department– Veterinary Directorate – MAFWM – Serbia

Parole chiave: Serbia, Peste Suina Classica, Analisi del Rischio, Indice

Key words: Serbia, Classic Swine Fever; Risk Analysis, Score Index

RIASSUNTO

La Serbia è uno degli stati dell'ex “former Jugoslavia” prossimo candidato all'ingresso nella UE. A tal fine si stanno mettendo in atto tutti quegli adempimenti necessari all'armonizzazione dei sistemi amministrativi e di controllo alla legislazione UE. Il Ministero per le Politiche Agricole e Forestali della Serbia è beneficiario, dal 2010, di un progetto europeo per la eradicazione ed il controllo della Peste Suina Classica e la Rabbia. In tale contesto si è provveduto a sviluppare un sistema di categorizzazione del rischio sanitario all'interno degli allevamenti di suini, con speciale considerazione per la PSC. La valutazione del rischio, effettuata con un sistema che prevede l'assegnazione di un punteggio numerico per ogni parametro preso in considerazione, ha fornito una fotografia reale, obiettiva della vulnerabilità sanitaria delle aziende suinicole serbe. I risultati del monitoraggio effettuato, alla data del 12 ottobre 2012, su circa 24.000 allevamenti serbi ha fornito interessanti elementi tali da indirizzare le politiche gestionali sanitarie del Governo Serbo e da proporsi come interessante metodologia per una maggior integrazione ed uniformazione del sistema di gestione della Sanità Animale a livello di Stati Membri, potenziali e non, della UE.

ABSTRACT

Serbia is one of the states of old “former Yugoslavia” next candidate for entry into the EU. To this aim Serbian Government is implementing all those necessary steps for the harmonization of the administrative and control procedures to EU standards. The Ministry for Agriculture and Forestry of Serbia is the beneficiary, since 2010, of a European project for the eradication and control of Classical Swine Fever and Rabies. In this context, it was decided to develop a system of categorization of health risks within pig holdings, with special concernment for CSF. The risk assessment carried out by a system that assigns a numerical score for each parameter considered, provided an objective picture of health vulnerability of pig holdings in Serbia. The results of the monitoring, carried out till 12 October 2012, on roughly 24,000 farms provided interesting useful elements to address health management policies of the Serbian Government and by itself, as an interesting methodology for further integration and standardization of animal health management at the level of Member States, potential and non-EU.

INTRODUZIONE

La Repubblica di Serbia è un Paese prossimo candidato all'adesione all'Unione Europea e si sta adoperando per armonizzare i propri sistemi amministrativi e di controllo alla legislazione UE. Nel mese di ottobre 2005 Il Parlamento Serbo ha adottato la Normativa relativa alla Sanità in Medicina Veterinaria (G.U. della RS n.°91/2005) e nel 2009 le procedure per il controllo e l'eradicazione della Peste Suina Classica dal proprio territorio (G.U. della RS n.°102/2009).

Dal 2010 la Repubblica di Serbia è beneficiaria di un Progetto UE denominato: "Technical Assistance for the Control and Eradication of Classical Swine Fever (CSF) and Rabies in Serbia", la cui finalità, nel medio-lungo termine, è la eradicazione di queste due importanti patologie dal contesto territoriale serbo.

La Peste Suina Classica (PSC) è una delle malattie che hanno causato gravi danni socio-economici nell'Unione Europea nel corso degli ultimi decenni. Anche se ultimamente sono stati compiuti notevoli progressi per l'eradicazione e la prevenzione di tale patologia, la minaccia di un'epidemia esiste ancora.

La ragione principale è che tale virus è ancora presente nei suidi selvatici (cinghiali) di alcuni Stati membri e/o confinanti.

In Serbia, le difficoltà di accesso a certe popolazioni di cinghiale rende difficile il monitoraggio clinico ed inoltre la raccolta di dati epidemiologici, in modo sostenibile, è estremamente difficile.

L'attuazione delle misure di profilassi veterinaria per la fauna selvatica è difficoltosa, costosa e ha bisogno di enormi risorse umane e tecniche. La vaccinazione, quindi, viene ancora utilizzata, nei suini domestici, come scelta elettiva per ridurre la circolazione virale. La densità di popolazione dei suidi selvatici, la potenziale condivisione degli stessi aerei con i suini domestici, le abitudini umane ed i sistemi tradizionali di allevamento, rappresentano in tale contesto, importanti e decisivi fattori di rischio per l'insorgenza di nuovi focolai di Peste Suina Classica.

L'eradicazione della PSC dalla Serbia e dagli altri paesi dei Balcani occidentali, presuppone quindi un'adeguata valutazione dei rischi della popolazione suina in allevamenti tradizionali e/o più o meno industrializzati presenti nel Territorio. Il programma di vaccinazione annuale sta manifestando un discreto successo, visto che dal dicembre 2010 non sono stati segnalati nuovi focolai della malattia. Tale pratica, però, deve essere quanto prima abbandonata in virtù del fatto che questa è una delle condizioni che devono essere soddisfatte per poter certificare le carni fresche di suino da esportare verso i mercati UE.

La maggior parte delle aziende suinicole serbe è, tradizionalmente, di piccole dimensioni (meno di 10 capi), a carattere familiare (Plavsic, 2012), con finalità di autoconsumo. Negli ultimi anni, però, si è assistito ad un progressivo aumento di aziende con potenzialità produttive decisamente maggiori. Nella regione centrale ed orientale del Paese vi è una predominanza di aziende deputate alla produzione di lattoni mentre unità di ingrasso sono prevalentemente presenti nel nord-ovest.

Contestualmente, un sostanzioso numero di suini viene ancora allevato, nei periodi estivi, allo stato brado, soprattutto in territori limitrofi al fiume Sava. Tali animali appartengono a diversi proprietari ed hanno potenzialità di contatto con la popolazione di suidi selvatici presenti nel territorio. Con l'inizio della stagione fredda, tali suini, vengono ripresi dai legittimi proprietari ed alloggiati in strutture all'interno delle aziende agricole.

La pratica poi dell'alimentazione mediante l'utilizzo di prodotti di scarto di lavorazione o rifiuti organici (swill feeding) va ancor più ad aggravare il rischio di contrarre PSC.

In questo scenario, quindi, l'adozione di idonee misure di Biosicurezza rappresenta un caposaldo fondamentale delle politiche sanitarie veterinarie del Paese.

Finalità

Scopo del presente lavoro è stato quello di dimostrare come la categorizzazione/classificazione delle unità produttive di suini e l'analisi del rischio effettuata con l'utilizzazione di punteggi numerici, relativi all'applicazione delle misure di Biosicurezza implementate, possano costituire un interessante strumento per la valutazione della "vulnerabilità sanitaria" del Territorio e per il supporto alle decisioni politiche per la prevenzione delle Peste Suina Classica.

MATERIALI e METODI

Dal dicembre 2010 il Dipartimento Veterinario (VD) del MAFWM della Serbia, attraverso i suoi organismi periferici e/o veterinari contrattisti, sta provvedendo alla categorizzazione di ogni singola unità produttiva suinicola, presente nel proprio territorio.

Tali allevamenti sono stati suddivisi in 5 differenti categorie secondo le seguenti caratteristiche:

- a. Azienda agricola "Commerciale"** – Allevamento, gestito direttamente dal proprietario e/o con l'aiuto di dipendenti; le strutture soddisfano quanto previsto dalla Normativa Vigente. L'allevamento è registrato all'anagrafe nazionale per i suini e implementa le principali misure igienico sanitarie e/o di biosicurezza. Gli animali vengono immessi nelle varie tipologie di mercato.
- b. Azienda Agricola "familiare" di Tipo A** – Struttura produttiva con più di 11 suini. Gestita solo dal proprietario e/o famiglia. E' registrata all'anagrafe nazionale per i suini; implementa le principali misure igienico sanitarie e/o biosicurezza. Gli animali sono venduti sia da riproduzione che da ristallo o inviati al macello
- c. Azienda Agricola "familiare" di Tipo B** - Struttura produttiva con più di 11 suini. Gestita solo dal proprietario e/o famiglia. E' registrata all'anagrafe nazionale per i suini; implementa alcune misure igienico sanitarie ed ha un insufficiente livello di biosicurezza. Gli animali sono venduti sia da riproduzione che da ristallo o inviati al macello
- d. Allevamento "rurale"(backyard)**– Unità produttiva con meno di 10 suini. Il livello di protezione della salute degli animali è scarso come pure insufficienti sono le misure igieniche e di biosicurezza. Suini allevati per autoconsumo.
- e. Allevamento "all'aperto"**– Unità produttiva in cui i suini sono allevati in uno spazio aperto o parzialmente aperto, con recinzione più o meno completa, che possono avere contatti con altri soggetti della stessa specie sia domestici che selvatici (cinghiali). Misure di biosicurezza scarse o assenti.

Sulla base dell'ottemperanza di 15 parametri, elencati, nella tabella 2, è stata poi effettuata la suddivisione in tre distinte classi di merito, delle unità produttive precedentemente menzionate.

Tabella 1 - Lista parametri da ottemperare per la classificazione delle aziende suinicole serbe

Table 1 - List of parameters to be fulfilled for the classification of pigfarms in Serbia

No.	Parametro
1	Notifica all’Autorità Competente (Veterinary Station) dell’applicazione delle misure sanitarie di prevenzione della PSC
2	Regolare e costante applicazione del programma sanitario previsto
3	Sorveglianza veterinaria dell’unità produttiva
4	Vaccinazione per PSC (secondo regolamento)
5	Registrazione dei trattamenti farmacologici e delle mortalità
6	Identificazione e registrazione dei suini all’anagrafe (I&R)
7	Emissione di certificati sanitari
8	Notifica di sospetto di malattia (PSC)
9	Analisi di laboratorio su animali deceduti e/o aborti
10	Presenza di recinzione perimetrale e misure sanitarie
11	Distanza da impianti di smaltimento di rifiuti, discariche ...
12	Utilizzo di rifiuti alimentari
13	Allevamento di suini in spazi confinati
14	Registrazione di tutte le patologie intercorse, le mortalità le misure igieniche e di biosicurezza
15	Contatto con suidi selvatici

Oltre alla categorizzazione e classificazione di queste aziende, è stata effettuata una valutazione generale dello stato sanitario (Stankovic, 2010) che ha tenuto conto dei programmi vaccinali, dei trattamenti effettuati, della tracciabilità delle movimentazioni dei suini e dell’igiene generale dell’allevamento.

Tale monitoraggio è stato effettuato da veterinari autorizzati, con l’ausilio di una checklist appositamente preparata. L’assolvimento o meno degli specifici parametri inclusi permetteva la suddivisione delle unità produttive in 4 classi diverse:

1. Insoddisfacente : la maggior parte dei parametri è disattesa;
2. Parzialmente soddisfacente: circa il 50 % dei parametri è soddisfatto;
3. Soddisfacente: la maggioranza dei parametri è soddisfatta;
4. Ottima: tutti i parametri sono soddisfatti.

Alla data del 12 ottobre 2012, sono state monitorate 115.559 unità produttive.

I sistemi di “valutazione” precedentemente descritti presentano, indiscutibilmente, una intrinseca natura “soggettiva” nella rilevazione del dato..

Al fine di evitare o ridurre ai minimi termini tale “coefficiente soggettivo” si è ipotizzato di mettere a punto un sistema che permettesse una univoca ed obiettiva valutazione del rischio di contrarre malattie (Sensi M. et al, 2007) e, nel nostro caso, specificatamente la Peste Suina Classica.

Si è provveduto, pertanto, a creare un apposito questionario, articolato in sei distinti item, comprensivi di parametri primari e parametri secondari. Per evitare, appunto, ogni possibile condizionamento dato dalla soggettività della rilevazione del dato, è stato assegnato un punteggio numerico (score) a ciascun parametro, sia primario che secondario (Barcelo, 1998).

Ogni item ha una potenzialità massima di punteggio riassunto nella tabella 2.

L'entità del "rischio", espressa numericamente, è data dalla risultanza della somma aritmetica dei parametri considerati, moltiplicati per un "coefficiente di correzione", diverso per ciascun item. Tali coefficienti, espressione della "valenza epidemiologica" di ciascun item all'interno della formula di calcolo, sono stati quantificati e concordati dal gruppo di epidemiologi coinvolti nel Progetto.

Lo "score", relativo ad ogni singola unità produttiva, ha una potenzialità massima di 56 punti. L'espressione numerica dell'entità del "rischio sanitario" permette la differenziazione dei vari allevamenti di suini in tre distinte categorie di rischio: basso, medio ed alto (Tabella 3).

Questa metodologia di approccio alla categorizzazione del rischio sanitario per le aziende di suini è stata sottoposta all'attenzione del Directorate Veterinario (VD) Serbo, che attraverso il Ministro dell'Agricoltura ha presentato tale proposta al Parlamento, per la necessaria approvazione. Una volta ottenuto il consenso, si è proceduto ad applicare il sistema su tutto il territorio nazionale, a seguito di un apposito Decreto Legislativo. Sono stati organizzati, quindi, dei corsi di formazione per i Veterinari incaricati dal Directorate Veterinario all'espletamento dei controlli in azienda.

I questionari, adeguatamente compilati in allevamento, da questi funzionari governativi, sono stati raccolti dal VD ed elaborati per mezzo di un software appositamente costruito per la "quantificazione" del "rischio sanitario" di ciascuna azienda suinicola. Tale programma è stato poi connesso al software generale della gestione della Sanità Animale in Serbia (VETUP), al fine di utilizzare le informazioni derivanti dal "risk assessment" delle unità produttive di suini, per indagini epidemiologiche e/o decisioni politiche sulla gestione sanitaria veterinaria del Territorio.

Tabella 2 Sistema di elaborazione del "punteggio"

Table 2. Score index system

	ITEM	Punteggio Max item (punti)	"coefficiente di correzione"	Valutazione Allevamento (score index)
1	Peste Suina Classica (ottemperanza disposizioni legislative e/o situazione pregressa)	27	7	1,89
2	Tipologia di allevamento	59	20	11,8
3	Ubicazione	42	18	7,56
4	Strutture	45	17	7,65
5	Movimentazioni	48	22	10,56
6	Gestione generale (management)	103	10	16,48
	Livello di "RISCHIO" sanitario	324		56,0 (max)

Sulla base dello “score” ottenuto, ogni singola unità produttiva è stata poi classificata in tre distinte categorie di rischio:

Tabella 3. Categorizzazione finale delle aziende suinicole serbe

Table 3. Final assessment of pig farms in Serbia

Livello di Rischio	Punteggio
Basso	Sino a 25
Medio	26 – 35
Alto	36 - 56

RISULTATI

Al 12 ottobre 2012 sono state censite e registrate nell’apposita anagrafe nazionale 148.927 allevamenti di suini (holdings). Tali aziende valutate sulle potenzialità produttive (numero capi) ed adozione di basilari misure di biosicurezza hanno avuto la categorizzazione riassunta nella tabella 4:

Tabella 4 Categorizzazione delle unità produttive sulla capacità e l’applicazione delle misure di biosicurezza

Table 4. Categorization of holdings based on capacity and application of biosecurity measures

No.	CATEGORIA	N.° di Allevamenti	%
	Azienda Agricola “Commerciale”	401	0,27
	Azienda Agricola “familiare” di Tipo A	305	0,21
	Azienda Agricola “familiare” di Tipo B	33.828	22,71
	Allevamento “rurale”	114.256	76,72
	Allevamento “all’aperto”	137	0,09
Totale		148.927	100%

Al contempo la classificazione delle aziende suinicole effettuata sulla base dell’ottemperanza dei 15 parametri elencati nella tabella 2 ha fornito il risultato qui di seguito elencato:

- Classe 1 (aziende in cui tutti i parametri sono risultati positivi) = 0,78 % del totale delle aziende controllate;
- Classe 2 (aziende in cui la maggioranza dei parametri è stata soddisfatta ad eccezione di alcuni definiti “criteri morbidi”) = 17,56 % del totale delle aziende controllate;
- Classe 3 (aziende in cui non sono stati soddisfatti uno o più parametri definiti come “criteri gravi”) = 81,66 % del totale delle aziende controllate.

La valutazione generale dello stato sanitario che ha tenuto conto dei programmi vaccinali, dei trattamenti effettuati, della tracciabilità delle movimentazioni dei suini e dell'igiene generale dell'allevamento è così risultata:

Insoddisfacente : la maggior parte dei parametri è disattesa = 8,22 % delle aziende controllate;

1. Parzialmente soddisfacente: circa il 50 % dei parametri è soddisfatto = 52,47 % delle aziende controllate;
2. Soddisfacente: la maggioranza dei parametri è soddisfatta = 37,47 % delle aziende controllate;
3. Ottima: tutti i parametri sono soddisfatti = 1,84 % delle aziende controllate;

Dal 1° aprile 2012, si è iniziato, attraverso la compilazione dell'apposito questionario e sopralluoghi aziendali ad effettuare la valutazione del rischio (risk assessment), dando priorità a quelle aziende incluse nelle prime tre categorie della tipologia aziendale, vale a dire: “commerciali” e “familiari di tipo A e B”.

Alla data del 12 ottobre 2012, circa 24.000 aziende suinicole sono state controllate e così suddivise nelle varie categorie di rischio:

Tabella 5: Categorizzazione finale delle aziende suinicole serbe (stato dell'arte al 12 ottobre 2012)

Table 5: Final assessment of pig farms in Serbia (updated 12oct2012)

Livello di Rischio	N.° di Aziende	Percentuale (%)
BASSO	2095	8,82
MEDIO	20530	86,48
ALTO	1114	4,70

DISCUSSIONE

La Repubblica di Serbia è il primo ed unico Paese in Europa ad aver implementato, a livello nazionale, con specifico decreto legislativo, un sistema di valutazione del rischio sanitario dei propri allevamenti di suini, basato su un modello articolato che prevede l'assegnazione di un punteggio numerico ad ogni parametro considerato (Score Index).

Il Progetto di Eradicazione della Peste Suina Classica dai Balcani ha fornito il presupposto e le necessarie risorse economiche per la realizzazione ed implementazione di tale metodologia di valutazione. I risultati ottenuti forniscono interessanti elementi per la gestione sanitaria territoriale.

Esso infatti ha permesso la suddivisione delle unità produttive in tre distinte classi di rischio (Alto, Medio e Basso) e la creazione di una “mappa sanitaria” (in fase di realizzazione grafica) al cui interno è facile identificare “punti di criticità”, costituiti dagli allevamenti che presentano gli “score” più alti.

L'articolazione in item ha permesso l'identificazione di quei settori e/o caratteristiche dell'allevamento, più carenti e/o bisognosi di urgenti miglioramenti.

Sulla base degli “score”, il Dipartimento Veterinario Serbo si sta adoperando affinché il Parlamento approvi lo stanziamento di fondi (contributi a fondo perduto, tassi di interesse bancario agevolati, ..etc) per quegli allevatori più “meritevoli” e/o anche “più bisognosi” di decisi miglioramenti per ciò che concerne la Biosicurezza.

E' palese che la "criticità" di ogni singola unità produttiva rende "critica" la situazione sanitaria dell'intero Territorio e, quale ulteriore sviluppo del progetto, ci stiamo adoperando per definire in maniera obiettiva ed univoca il "rischio sanitario" "anche a livello di territorio, vale a dire Municipalità, Regione, Nazione.

La particolare natura dell'approccio politico al problema, utilizzato dagli Organismi serbi deputati, ci sembra virtuosa, nell'ottica dell'ingresso della Serbia all'interno della UE.

CONCLUSIONI

I moderni sistemi di allevamento suino si basano principalmente sulla riduzione delle patologie all'interno di ciascuna unità produttiva. Questo da un lato comporta l'adozione di misure precauzionali atte alla minimizzazione del rischio (biosicurezza); dall'altro implica l'adozione di corrette procedure di allevamento (Good Management Practices – GMP). Quanto da noi applicato in Serbia sembra fornire uno strumento obiettivo di valutazione delle "situazioni di criticità sanitaria" di ogni singolo allevamento e di un Territorio e si propone come interessante mezzo da utilizzare per un approccio più moderno e "qualificato" alla "Gestione Sanitaria del Territorio" da parte dei Servizi Sanitari Nazionali.

Le caratteristiche di plasticità lo rendono, inoltre:

- fruibile da tutti gli Operatori del settore zootecnico
- utilizzabile, con le relative modifiche, per altre specie zootecniche
- condivisibile/estendibile ad altri Territori (confinanti e non)

Riteniamo, in conclusione, che le intrinseche potenzialità del sistema possano favorire una maggior integrazione ed uniformazione del sistema di gestione della Sanità Animale a livello di Stati Membri, potenziali e non, della UE.

BIBLIOGRAFIA

1. Barcelo J., Marco E., 1998. On farm biosecurity. In: Proceedings of the 15th Meeting IPVS, Birmingham, UK, pp. 129–133.
2. Plavšić B., Mićović Z., ČelebićaninSanja, Ostojić S., Hristov S., Tešić M., Stanojević S., Rutili D., Ivanov J. 2012. CSF Control And Eradication Strategy In Serbia, Proceedings of International Conference "Prevention Of Classical Swine Fever In The Border Region Croatia – Serbia (Stop – Csf)", 2-16
3. Sensi M., Moscati L., Costarelli S., Pistidda E., Marchi S., Battistacci L., (2007) "Definizione di un sistema obiettivo di valutazione dell'allevamento del suino dal punto di vista sanitario e del benessere animale nel contesto territoriale dell'attività svolta dal Servizio Sanitario Nazionale: prototipo sperimentale" Atti XXXIII meeting annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini 2007, 181- 188 ;
4. Stanković B., Hristov S., Bojkovski J., MaksimovićNevena, 2010. Health status and biosecurity plans on pig farms. *Biotechnology in Animal Husbandry* 26 (1-2):29-35.

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI TIAMULINA ALLE SCROFE IN SALA PARTO: PERFORMANCE DEI SUINETTI

EFFECTS OF TIAMULIN ADMINISTRATION IN LACTATING SOWS: PIGLETS PERFORMANCE

SCOLLO, A.^{1,2}, TONON, F.¹, CONTIERO, B.², MAZZONI, C.¹

¹ SUIVET; ² Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova;
Corresponding author scollo@suiwet.it

Parole chiave: tiamulina, performance riproduttive, accrescimento, scrofa, suinetti.

Key words: tiamulin, reproductive performance, growth, sow, piglets.

Riassunto

Le patologie enteriche infettive sono un problema comune negli allevamenti suinicoli italiani, e l'utilizzo di antibiotici nell'alimento come intervento terapeutico è largamente adottato. Scopo del presente lavoro è stato indagare i principali parametri riproduttivi di scrofe trattate con tiamulina durante l'intera lattazione, e valutare le performance zootecniche della nidiata fino a 53 giorni di vita, con particolare attenzione all'accrescimento dei suinetti sottopeso. Sono rientrate nella prova 157 nidiata di suinetti, suddivise in 2 gruppi di trattamento: controllo e tiamulina. All'interno di ciascun gruppo di trattamento, le scrofe sono state suddivise per ordine di parto e classe di spessore del lardo dorsale al parto. Nelle scrofe sono stati registrati spessore di lardo al parto e allo svezzamento, e le performance riproduttive fino alla successiva fecondazione. Le nidiata sono state pesate al parto e allo svezzamento, e l'accrescimento di 101 suinetti sottopeso è stato individualmente seguito fino a 53 gg. La somministrazione di tiamulina a scrofe in lattazione ha migliorato le performance riproduttive delle nidiata fino allo svezzamento. Tuttavia, la transitoria perdita di accrescimento successivo richiede ulteriori approfondimenti per l'identificazione di un protocollo terapeutico con tiamulina completo ed efficace in tutte le fasi di accrescimento.

Abstract

Infective enteric diseases are a common problem in Italian swine herds, and the use of antibiotics in feed as a therapeutic tool is widely adopted. Aim of this study was to investigate the main reproductive parameters of sows treated with tiamulin during their entire lactation, and evaluate the livestock performance of litters up to 53 days of life, with particular attention to underweight piglets growth. Were used 157 litters of piglets, divided into two treatment groups: control and tiamulin. Within each treatment group, sows were divided for parity and class of backfat thickness at farrowing. Parameters recorded in sows were backfat at farrowing and at weaning, and reproductive performance until the next service. The litters were weighed at birth and at weaning, and the growth of 101 underweight piglets were individually followed up to 53 days. The administration of tiamulin in lactating sows improved reproductive performance of litters until weaning. However, the following transient decreased growth requires further study for the identification of a complete and effective therapeutic protocol with tiamulin at all stages of growth.

INTRODUZIONE

Le patologie enteriche infettive sono un problema comune negli allevamenti suinicoli italiani: l'ileite è diffusa nell'85% delle aziende (Alborali et al., 2006), e la prevalenza di *Lawsonia*

intracellularis nei siti di ingrasso e finissaggio che presentano sintomatologia clinica sembra essere particolarmente elevata (44-59%). Le infezioni enteriche sono frequentemente miste, con compresenza di *Brachyspira species*, *L. intracellularis* e *Salmonella species* (Meriardi et al., 2003) e talora si osservano anche nelle scrofette, soprattutto per quanto riguarda *L. intracellularis*, e nelle scrofe.

Durante i periodi di maggiore stress per gli animali, come ad esempio il post-svezzamento, o in caso di elevata circolazione dei patogeni enterici, l'utilizzo di antibiotici nell'alimento o nell'acqua di bevanda come intervento terapeutico è largamente adottato. Un efficace controllo dei microrganismi patogeni migliorando le condizioni di integrità della mucosa è infatti in grado di aumentare l'utilizzo dei nutrienti alimentari da parte dei suini con conseguenti migliori performance di crescita (Gaskins and Collier, 2002). Steidinger et al. (2009) riportano un maggiore accrescimento giornaliero e aumentate assunzioni alimentari in suinetti trattati all'inizio dello svezzamento, con miglioramento delle performance zootecniche rispetto agli animali non trattati con conseguente ritorno economico dell'azienda.

Tra le molecole attive contro *Brachyspira species* vi è la tiamulina: in un recente studio, Ritzmann et al. (2009) hanno osservato suscettibilità a questo principio attivo nel 79,2% degli isolati di *B. hyodysenteriae* da campioni di feci suine, malgrado la crescente preoccupazione per l'insorgenza di resistenza agli antibiotici e alcuni recenti casi di scarsa suscettibilità a diverse molecole in isolati di *B. hyodysenteriae* in Spagna e Repubblica Ceca (Pringle et al., 2012; Hidalgo et al., 2011; Sperling et al., 2011). La tiamulina è inoltre attiva anche contro *L. intracellularis*: Wattanaphansak et al. (2009) la descrive infatti come uno tra gli antibiotici con maggiore attività intracellulare in vitro contro questo patogeno (MIC \leq 0,5 μ g/ml).

Numerosi studi hanno inoltre valutato, in diverse fasi del ciclo di allevamento del suino, l'efficacia *in vivo* della tiamulina nei confronti di infezioni sia da *L. intracellularis*, sia da *B. hyodysenteriae*, utilizzandola in particolare in piani di eradicazione della dissenteria suina (Borge and Hansen, 2000; Kriegler et al., 2012; Lopez et al., 2012; Cano et al., 2012). In tali lavori vengono evidenziati i miglioramenti di performance di crescita e riproduttive e valutato il ritorno economico del trattamento. Tuttavia, la bibliografia manca di dati riguardanti le performance di crescita post-svezzamento di nidiata con madre trattata con tiamulina durante la lattazione. Scopo del presente lavoro è stato dunque indagare i principali parametri riproduttivi di scrofe trattate con tiamulina durante l'intera lattazione, e valutare le performance zootecniche della nidiata con particolare attenzione alla fase dello svezzamento seguita fino a 53 giorni di vita. Inoltre, durante la prova sono state valutate eventuali differenze nelle performance dei suinetti sottopeso, in quanto categoria maggiormente a rischio e fonte di più facili perdite economiche per l'allevamento.

MATERIALI E METODI

Animali e management

L'azienda era endemica per infezione da *B. hyodysenteriae* e presentava casi di colite nelle scrofe, ciò che ha motivato la necessità di un intervento antibiotico. Sono rientrate nella prova 157 nidiata di suinetti, nate da altrettante scrofe di genetica Goland suddivise in 4 bande di un allevamento intensivo convenzionale. Le scrofe sono entrate in sala parto 7 giorni prima della data prevista per il parto, corredate ciascuna da una scheda per la registrazione individuale dei dati della madre e della nidiata. Il giorno del parto è stato fatto un sommario pareggiamento all'interno dei gruppi di trattamento per uniformare il peso ed il numero dei lattonzoli, per poi lasciare inalterata la nidiata fino allo svezzamento effettuato a 24 giorni. Allo svezzamento i suinetti sono stati spostati in un capannone adiacente appartenente allo stesso allevamento, stabulando in ciascun box i soggetti appartenenti a 2 nidiata (circa 25 suinetti, 0,20 m²/capo). Gli svezzati hanno infine lasciato l'allevamento all'età di 8 settimane.

Tra tutti i suinetti sono stati selezionati 101 soggetti, ai quali è stata applicata il giorno della nascita una marca auricolare per la loro identificazione individuale fino all'età di 8 settimane.

Trattamenti

Le scrofe e le relative nidiate sono state suddivise in 2 gruppi di trattamento: alle scrofe del primo gruppo (2 bande, 82 nidiate totali) è stata somministrata tiamulina idrogeno fumarato (Denagard®, Novartis Animal Health S.p.A.) a partire dal loro ingresso in sala parto fino allo svezzamento al dosaggio di 2 mg per kg di peso vivo (1 g/scrofa per un peso medio di 250 kg) conformemente a quanto già fatto in altri lavori (Cano et al., 2012). Le scrofe del secondo gruppo (2 bande, 73 nidiate totali) erano di controllo, con conduzione standard e nessun trattamento specifico aggiuntivo. All'interno di ciascun gruppo di trattamento, le scrofe sono state suddivise per ordine di parto e classe di spessore del lardo dorsale al parto (Tab. 1).

Ordine di parto	Descrizione
Gruppo 1	Primipare
Gruppo 2	Scrofe giovani; dal 2° al 5° parto
Gruppo 3	Scrofe vecchie; dal 6° al 10° parto

Classe di spessore del lardo dorsale al parto	Descrizione
Gruppo 1	Scrofe magre; valori di spessore del lardo da 6 a 11
Gruppo 2	Scrofe di media corporatura; valori di spessore del lardo da 12 a 16
Gruppo 3	Scrofe grasse; valori di spessore del lardo da 17 a 27

Tabella 1. Gruppi di osservazione delle scrofe all'interno di ciascuno dei due trattamenti. I 101 soggetti individualmente tracciati (40 del gruppo trattamento con tiamulina, 61 del gruppo controllo) sono stati suddivisi in 2 sottogruppi a seconda del loro peso individuale: sottopeso (peso compreso tra 500 e 900 g; n = 51) e normopeso (peso compreso tra 950 e 1200 g; n = 50).

Rilevazioni

Per ciascuna scrofa sono stati registrati:

- Numero di nati vivi
- Numero di suinetti schiacciati fino allo svezzamento
- Numero di suinetti scartati per scarso accrescimento o destinati all'adozione
- Numero di suinetti morti per cause differenti dalle precedenti
- Numero di suinetti svezzati
- Fertilità del ciclo successivo: intervallo svezzamento-estro (ISE) e intervallo svezzamento-concepimento (ISCU)

Inoltre a tutte le scrofe è stato misurato lo spessore del grasso dorsale in P2 il giorno dopo il parto ed il giorno dello svezzamento. Per la rilevazione del dato si è utilizzato l'apposito strumento ad ultrasuoni Lean-Meater (Renco Corporation, USA) posizionato 6 cm lateralmente alla colonna vertebrale all'altezza dell'ultima costa.

Ciascuna nidiate è stata pesata il giorno del parto ed il giorno dello svezzamento. Inoltre, i 101 soggetti con marca auricolare sono stati pesati individualmente alla nascita, allo svezzamento (24 gg) e al termine della fase di accrescimento nell'allevamento in questione (53 gg).

Analisi statistica

I dati raccolti sono stati utilizzati per il calcolo di variabili aggiuntive:

- Incremento medio di peso vivo dalla nascita allo svezzamento per ciascuna nidiata
- Incremento individuale dei marcati dalla nascita allo svezzamento, dallo svezzamento ai 53 giorni e dalla nascita ai 53 giorni
- Differenza allo svezzamento tra l'incremento individuale dei suinetti marcati e della nidiata di provenienza
- Perdita di grasso dorsale delle scrofe dal parto allo svezzamento

Gli effetti fissi considerati sono stati il gruppo di trattamento con tiamulina, l'ordine di parto e la classe di spessore del lardo dorsale al parto delle scrofe (Tab. 1).

I dati sono stati inizialmente analizzati per valutarne la loro distribuzione Gaussiana tramite il test di normalità di Shapiro-Wilk (XLSTAT). Le variabili non distribuite normalmente (numero di schiacciati, scarti, morti totali, ISE e ISCU) sono state analizzate per confronto tra k proporzioni (XLSTAT), ad eccezione dei dati relativi alla fertilità del ciclo successivo (ISE e ISCU) che invece sono stati analizzati con un'analisi non parametrica. I dati con distribuzione normale (incremento medio di peso vivo dalla nascita allo svezzamento per nidiata, perdita di grasso dorsale delle scrofe dal parto allo svezzamento e tutte le variabili relative ai dati individuali dei sottopeso) sono invece stati processati con una PROC GLM (SAS 9.2) valutando gli effetti fissi e le loro interazioni. Le medie sono state corrette utilizzando il test di Bonferroni.

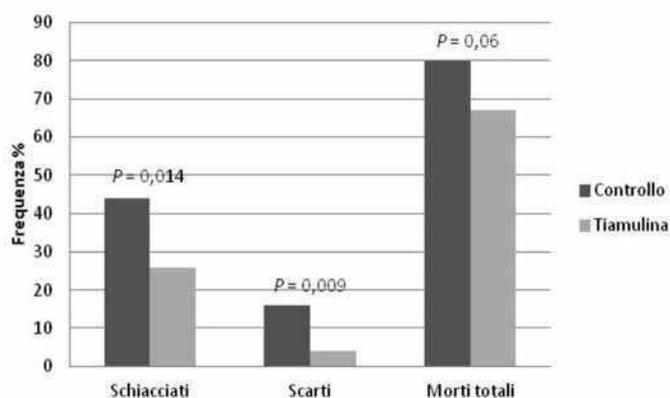


Figura 1. Percentuale di nidiata in cui si è verificato almeno 1 caso di suinetti schiacciati, scartati o morti in generale.

RISULTATI

Le nidiata del gruppo di trattamento con tiamulina hanno raggiunto migliori livelli di sopravvivenza rispetto al gruppo controllo nel periodo compreso tra la nascita e lo svezzamento. Tutti i parametri rilevati hanno infatti mostrato differenze statisticamente significative a favore del gruppo trattato (Fig. 1). In particolare, la somministrazione di tiamulina alle scrofe in sala parto ha ridotto sensibilmente la frequenza di schiacciamenti nella gabbia parto ($P = 0,014$) e le perdite dovute ai suinetti che, per il loro ridotto accrescimento durante l'allattamento, sono stati considerati come scarti e non sono arrivati allo svezzamento ($P = 0,009$). Ridotto anche il numero di nidiata in cui si è verificata una mortalità di qualsiasi origine, anche se con valori che rappresentano una significatività statistica meno marcata ($P = 0,06$). Le interazioni tra la somministrazione di tiamulina e l'ordine di parto della scrofa o il suo spessore di lardo dorsale al parto non hanno dato significatività statistica.

Durante l'allattamento, le nidiatae nate da madri trattate con tiamulina hanno avuto incremento medio di peso vivo maggiore rispetto alle nidiatae del gruppo controllo ($5,47 \pm 0,11$ kg e $4,92 \pm 0,18$ kg rispettivamente; $P = 0,003$; Fig. 2).

Le madri invece non hanno mostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per quanto riguarda la loro perdita di spessore di lardo dorsale tra il giorno del parto ed il giorno dello svezzamento, né per le performance riproduttive del ciclo successivo (ISE e ISCU) ($P > 0,05$).

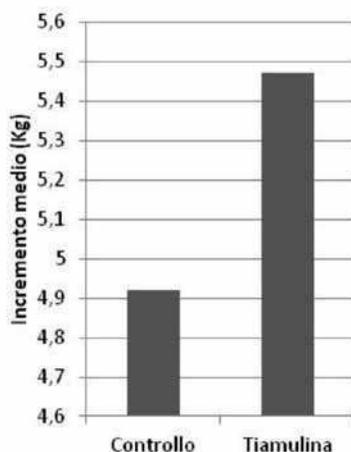


Figura 2. Incremento medio del peso vivo dei suinetti durante l'allattamento all'interno delle nidiatae del gruppo trattato con tiamulina e del gruppo controllo.

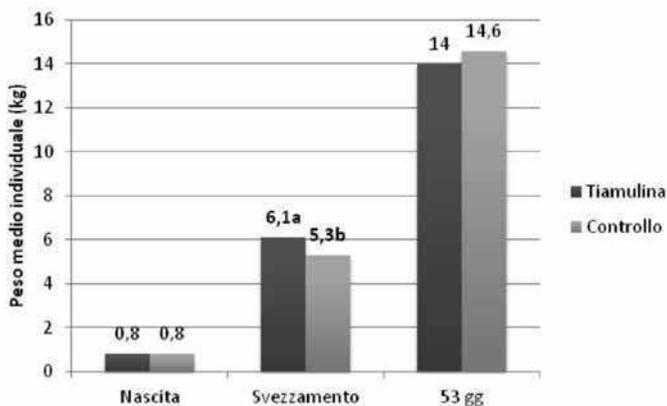


Figura 3. Peso medio dei suinetti con marca auricolare* durante l'intera prova all'interno delle nidiatae del gruppo trattato con tiamulina e del gruppo controllo.

*I valori riportati rappresentano la media dei valori ottenuti da tutti i suinetti con marca auricolare (500 – 1200 g), senza alcuna divisione tra sottopeso e normopeso.

Il maggiore incremento medio di peso vivo registrato nelle nidiatae del gruppo trattato con tiamulina si è ottenuto anche nei soggetti sottopeso pesati individualmente alla nascita e allo svezzamento ($P = 0,002$). Ugual incremento di peso si è registrato per i sottopeso (500 – 900 g) e per i normopeso (950 – 1200 g), pertanto i dati riportati in tabella 4, figura 3 e 4 rappresentano la media dei due

gruppi (500 – 1200 g). Il vantaggio nell'accrescimento ottenuto sotto scrofa tuttavia si perde tra il giorno dello svezzamento ed i 53 giorni ($P = 0,0004$), fino a raggiungere un'uguaglianza statistica tra il gruppo trattato ed il gruppo controllo considerando l'incremento nell'intero periodo dalla nascita ai 53 giorni (Tab. 3). Nessuna interazione è stata dimostrata tra i gruppi di trattamento e l'ordine di parto delle scrofe o il loro spessore di grasso dorsale al parto.

DISCUSSIONE

Durante il periodo della lattazione, le performance delle scrofe trattate con tiamulina sono state migliori di quelle ottenute nel gruppo controllo, in accordo con quanto riportato in letteratura (Cano et al., 2012; Palomo et al., 2012). Infatti, sebbene le scrofe non abbiano mostrato alcuna differenza tra gruppi per quanto riguarda la perdita dello spessore del grasso dorsale durante la lattazione né per le performance riproduttive del ciclo successivo (ISE e ISCU), i suinetti del gruppo trattato con tiamulina hanno avuto minori perdite. Le migliori performance di queste nidiate, senza differenze tra suinetti sottopeso e normopeso, sono state ottenute con il minor numero di animali schiacciati, scartati o morti per altre cause, ma anche per un maggiore incremento di peso durante la lattazione. Questi risultati potrebbero essere associati ad una maggiore produzione di latte nelle scrofe trattate, come risposta alla riduzione del carico batterico patogeno intestinale. Cano et al. (2012) suggeriscono in particolare il ruolo negativo delle infezioni croniche da *L. intracellularis*: la somministrazione di tiamulina alle scrofe ridurrebbe infatti l'impiego di energia nell'attivazione del sistema immunitario per destinarla a funzioni riproduttive ed alla produzione di latte. L'ipotesi è supportata da Colditz (2002), che descrive i costi metabolici derivanti da una risposta immunitaria, responsabile della deviazione dei nutrienti dalla produzione (di latte, carne o anche lana) a favore dei meccanismi di difesa dell'ospite. La minore produzione di latte è direttamente associabile alla riduzione dell'incremento di peso della nidiate per ridotta assunzione di alimento, ma anche alle maggiori perdite in termini di mortalità. I suinetti schiacciati dalla scrofa sono infatti con maggiore probabilità i soggetti con scarso incremento di peso e conseguente maggiore necessità di nutrienti, che passano più tempo rispetto agli altri in prossimità della madre per avere accesso al capezzolo o per trovare maggiore calore (Weary et al., 1996).

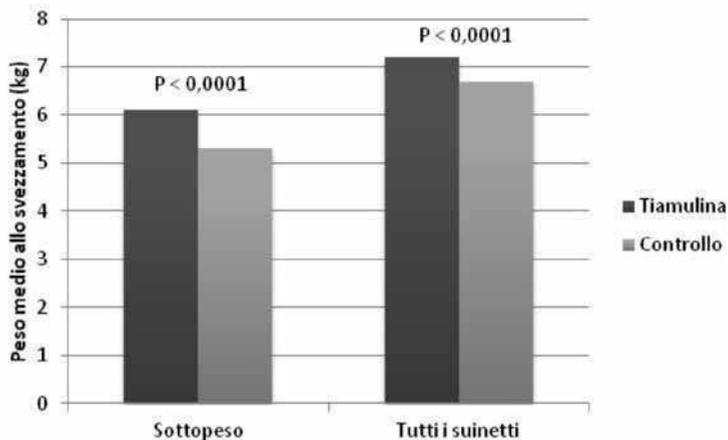


Figura 4. Peso medio allo svezzamento dei suinetti con marca auricolare* e delle nidiate intere allo svezzamento all'interno del gruppo trattato con tiamulina e del gruppo controllo.

*I valori riportati rappresentano la media dei valori ottenuti da tutti i suinetti marcati (500 – 1200 g), senza alcuna divisione tra normopeso e sottopeso.

	Tiamulina (kg)	Controllo (kg)
Pesate di gruppo (per nidiata):		
Peso medio Suinetti alla nascita	1,6 ± 0,1	1,6 ± 0,1
Suinetti allo svezzamento	7,2 ± 0,2^a	6,7 ± 0,2^b
Incremento peso vivo Da nascita a svezzamento	5,5 ± 0,1^a	4,9 ± 0,2^b
Pesate individuali (suinetti marcati*):		
Peso medio Suinetti alla nascita	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Suinetti allo svezzamento	6,1 ± 0,2^a	5,3 ± 0,2^b
Suinetti a 53 giorni	14,0 ± 0,4	14,6 ± 0,4
Incremento peso vivo Da nascita a svezzamento	5,6 ± 0,2^a	4,7 ± 0,2^b
Da svezzamento a 53 gg	7,3 ± 0,4^b	8,9 ± 0,4^a
Da nascita a 53 gg	13,1 ± 0,4	13,9 ± 0,4

Tabella 4.

Valori (kg) ottenuti dalle pesature di gruppo (per nidiata) ed individuale (suinetti marcati*).

**I valori riportati rappresentano la media dei valori ottenuti da tutti i sottopeso (500 – 1200 g), senza alcuna divisione tra normopeso e sottopeso.*

Tuttavia i risultati di Stipkovitset al. (1988, 1990) suggeriscono l'ipotesi di un addizionale ruolo della tiamulina nelle migliori performance di crescita dei suinetti di madri trattate. Nei due citati lavori infatti, gli autori affermano che la molecola venga escreta nel latte a concentrazioni sufficienti da avere valore terapeutico nei lattonzoli. Molto più recentemente, Supple et al. (2012) descrivono la curva di concentrazione della tiamulina nel siero e nel latte delle stesse scrofe trattate, mostrando che la concentrazione della molecola nel latte arriva ad essere più di 20 volte maggiore rispetto al siero. Secondo questi risultati quindi, il miglioramento delle performance dei suinetti potrebbe essere associato anche all'effetto diretto della tiamulina con meccanismo paragonabile ai promotori di crescita e che, eventualmente, potrebbe far sollevare osservazioni sullo sviluppo di antibiotico resistenza (Dibner and Richards, 2005).

Allo svezzamento, i suinetti delle scrofe trattate con la tiamulina hanno mostrato una diminuzione dell'accrescimento rispetto al gruppo controllo, fino al raggiungimento di un'eguaglianza statistica tra i pesi dei due gruppi a 53 giorni di vita. Una prima ipotesi per spiegare questo risultato è la crescita compensativa del gruppo controllo. Ryan (1990) descrive un aumentato accrescimento dopo un periodo di restrizione alimentare, ma in letteratura sono elencati tra le cause anche cambiamenti della dieta, una mutata efficienza nell'utilizzazione dell'energia e delle proteine e una minore richiesta di energia per il mantenimento (Yambayamba et al., 1996). È possibile che il gruppo controllo abbia subito una crescita compensativa dopo una lattazione meno abbondante a causa della presenza di forme enteriche nelle scrofe, con l'aggravante di una eventuale flora batterica non ottimale dovuta alla contaminazione fecale della gabbia parto. Tuttavia, una seconda ipotesi è la riduzione dell'accrescimento delle nidiata da scrofa trattata. Assumendo che i suinetti abbiano ingerito la tiamulina tramite il latte, è possibile che la loro flora intestinale abbia subito una selezione che ha prodotto come risultato un aumento dell'efficienza di assorbimento intestinale.

Dibner and Richards (2005) descrivono una condizione di minore competitività delle risorse tra popolazioni batteriche intestinali tali da rendere l'antibiotico uno strumento promotore di crescita, che riduce lo spessore delle pareti intestinali aumentandone le capacità di assorbimento ed infine riduce i patogeni opportunisti a vantaggio dell'ospite. Tuttavia, le alterazioni anatomiche dei villi intestinali e la modificazione della microflora possono rappresentare un problema al termine della somministrazione del farmaco, in quanto le condizioni fisiologiche vengono ripristinate il più rapidamente possibile (Savino et al., 2011). Proprio questa fase di ripristino degli equilibri microbici potrebbe essere alla base di una ridotta efficienza intestinale post trattamento.

Concludendo, la somministrazione di tiamulina a scrofe in lattazione portatrici di *B. hyodysenteriae* migliora le performance della nidata fino allo svezzamento, sia in termini di riduzione della mortalità neonatale sia per l'aumentato accrescimento. Inoltre, il passaggio della molecola nel latte potrebbe aver consentito nei suinetti un positivo condizionamento della flora enterica. Tuttavia, la transitoria perdita di accrescimento subito dopo lo svezzamento richiede ulteriori approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

- Alborali et al., 2006. Study on seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in Italian swine herds. Proc. of the 19th IPVS Congress, Copenhagen, Denmark.
- Borge L.V. and Hansen K.K. Eradication of *Brachyspira* (Serpulina) *Hyodysenteriae* in breeding to finishing unit by combined tiamulin medication and cleaning/disinfection. 16th IPVS Congress, 2000.
- Cano N.G., Martinez C., Piqué J., Bruguera S., 2012. Effect on reproductive performance of 100ppm tiamulin hydrogen fumarate added to the sow diet during the lactation period. . 22nd IPVS Congress, 2012.
- Colditz I.G., 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livestock Production Science* 75 (2002) 257–268.
- Dibner J.J. and Richards J.D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84:634-643.
- Gaskins HR, Collier CT (2002) Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol* 13: 29–42.
- Hidalgo A, Carvajal A, Vester B, Pringle M, Naharro G, Rubio P: Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55:3330–3337.
- Kreigler W., Kixmoeller M., Autis-Busse R.L., Klein U., 2012. Cost benefit analysis of treating sub-clinical ileitis with tiamulin or tylosin in a German commercial finisher farm. 22nd IPVS Congress, 2012.
- Lopez J.A., Piqué J., Bruguera S., 2012. Pig growth efficiency: a comparison of tylosin phosphate premix and tiamulin hydrogen fumarate premix treatments in a fattening pig unit in Murcia (Spain). 22nd IPVS Congress, 2012.
- Meriardi G., Bonilauri P., Granelli F., Luppi A., Dottori M., 2003. Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. *Veterinary Record* 153:529-530.

- Palomo A., Quintana C., Garcia J.M., Piqué J., Bruguera S., 2012. Effect of adding of 100ppm tiamulin hydrogen fumarate (Denagard 100) in sow's feed during lactation. 22nd IPVS Congress, 2012.
- Pringle M., Landén A., Unnerstad H.E., Molander B. and Bengtsson B., 2012. Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2012, 54:54.
- Ritzmann, M., Palzer, A., Verspohl, J., Baier, S., Schulte-Wülwer, J., Nienhoff, H., Harlizius, J., Grotthoff, W. S., Rohde, J., 2009. Monitoring of the detection of *Brachyspira* spp. in swine suffering from diarrhoea and the sensitivity of *Brachyspira hyodysenteriae* as well as other *Brachyspira* spp. to tiamulin throughout Germany. *Praktische Tierarzt* 90, 5:467-473.
- Ryan, W. J., 1990. Compensatory growth in cattle and sheep. *Nutrition Abstracts and Reviews. Series B, Livestock Feeds and Feeding* 1990 Vol. 60:653-664.
- Savino F, Roana J, Mandras N, Tarasco V, Locatelli E, Tullio V. 2011. Faecal microbiota in breast-fed infants after antibiotic therapy. *Acta Paediatrica* 100:75–78.
- Sperling D, Smola J, Cizek A: Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet Rec* 2011, 168:215.
- Steidinger, M.U., M.D. Tokach, D. Dau, S.S. Dritz, J.M. DeRouchey, R.D. Goodband, and J.L. Nelssen. Comparison of different antibiotic sequences on nursery pig performance and economic return. *Swine Day 2009, Report of Progress* 1020, pp 122-131.
- Stipkovits L, Czifra GY, Csiba E, Laber G, Miller DJS. (1990) Simultaneous medication of pigs with salinomycin or monensin and Tiamutin. *Proc., XI IPVS Congress, Lausanne, Switzerland*, p. 350.
- Stipkovits L, Szabo I, Antal T, Laber G. (1988) Tolerance and pharmacokinetic studies with Tiamutin on newborn piglets. *Proc., European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress, Budapest*.
- Supple A., Mechler D., Pitcher P., Jacela J., Hammer M., 2012. Effect of Denagard Liquid Concentrate on plasma and milk concentrations of tiamulin in sows. 2012 AASV Annual Meeting: Integrating Science, Welfare, and Economics in Practice.
- Wattanaphansak S., Singer R.S., Gebhart C.J., 2009. In vitro antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates. *Veterinary Microbiology* 134:305–310.
- Weary D.M., Pajor E.A., Thompson B.K., Fraser D., 1996. Risky behaviour by piglets: a trade off between feeding and risk of mortality by maternal crushing? *Animal Behaviour* 51:619–624.
- Yambayamba E S, Price M A and Foxcroft G R, 1996. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *J ANIM SCI* 1996, 74:57-69.

IL RUOLO DEL COLOSTRO NELL'INCREMENTO DI PESO VIVO DEL SUINETTO DURANTE LE PRIME 10 SETTIMANE DI VITA.

THE ROLE OF COLOSTRUM IN THE INCREASE IN LIVE BODY WEIGHT OF THE PIGLET DURING THE FIRST TEN WEEKS OF LIFE.

PIANCASTELLI, C., BORRI, E., CATELLI, E., MAZZONI, C.

Liberi professionisti-SUIVET, Reggio Emilia

Parole chiave: colostro, istocompatibilità, suinetti sottopeso, svezzamento, scrofa di balia

Key words: colostrum, histocompatibility, underweight piglets, weaning, nurse sow

Riassunto

All'interno dell'allevamento suino una delle fasi più critiche e delicate è la prima settimana di vita dei suinetti sottoscrofa. Durante questi giorni infatti i neonati sono esposti a numerosi fattori che possono incidere sulla loro capacità di sopravvivenza tra cui la temperatura esterna, le condizioni igienico-sanitarie, la presenza di patologie perinatali, la numerosità della nidata, il peso vivo alla nascita e l'assunzione precoce di colostro. Questo secreto risulta indispensabile per la sopravvivenza dei suinetti, in quanto rappresenta il principale veicolo di immunoglobuline e di sostanze energetiche per permettere il movimento degli animali stessi ed il mantenimento della termoregolazione.

In questo studio sono stati presi in considerazione suinetti sottopeso alla nascita e sono stati alimentati durante le prime 24 ore di vita con differenti quantità e tipologie di colostro per valutare quanto la presenza di una buona immunità passiva possa incidere sulla variazione di peso degli stessi animali all'età dello svezzamento. Particolare attenzione è stata posta all'esistenza del fenomeno di istocompatibilità, attraverso il quale i suinetti sono in grado di assorbire solo i leucociti presenti nel colostro proveniente dalla propria madre. Questo andrebbe a modificare concettualmente la normale tipologia di gestione delle adozioni in sala parto.

Abstract

One of the most critical moments in the swine farm is the first week of life in the piglets under sow. During these days the newborn piglets are exposed to a lot of factors that can heavily influence their survival ability, such as the environmental temperature, sanitary conditions, the presence of neonatal pathologies, the number of piglets inside the litter, the body weight at the time of birth and the quick assumption of colostrum.

This secrete is pivotal for the survival of the piglets because it represents the principal vehicle of immunoglobulins and energetic substances that are indispensable for the movement of the animals and the maintenance of their thermoregulation.

This study considers low-body-weight piglets that have been fed with different quantity and types of colostrum during the first 24 hours of life, in order to evaluate the extent to which a good degree of passive immunity can influence body weight at weaning time.

Particular emphasis has been put on the existence of the histocompatibility phenomenon. Thanks to this mechanism the piglets are able to simply absorb the leukocytes that are present in their mother's colostrum. This knowledge can modify the standard typology of cross fosterings management in the swine delivery rooms.

INTRODUZIONE

La mortalità dei suinetti nel periodo pre svezzamento, in particolare durante i primi tre giorni di vita non solo rappresenta un'importante perdita per l'allevamento suino ma anche un essenziale indicatore di benessere animale. La percentuale di mortalità può variare dal 10% al 25% in base alla tipologia dell'azienda considerata (Tucscherer *et al.*, 2000; Edwards, 2002; Alonso-Spilsbury *et al.*, 2007) e il 50% delle morti sotto scrofa avviene durante le prime 72 ore di vita dei suinetti (Dick e Swierstra, 1987).

La scrofa possiede una placenta di tipo epiteliocoriale che non permette il passaggio di anticorpi per cui i suinetti nascono privi di immunità passiva e risultano più sensibili all'azione di patogeni esterni. Questo fatto rende ancor più indispensabile per la sopravvivenza il passaggio degli anticorpi materni attraverso il colostro (Alonso-Spilsbury M. *et al.*, 2007; Le Dividich *et al.*, 2005). L'ingestione di questo trasudato, che fornisce al suinetto sia energia prontamente disponibile che protezione immunitaria, diventa di estrema importanza per la sopravvivenza dell'animale stesso e deve avvenire entro 10-30 minuti dalla nascita. Le cellule immunitarie contenute nel colostro (neutrofili, linfociti, macrofagi ed eosinofili) rappresentano l'80% dell'1-3 milioni di cellule per ml presenti e questa proporzione diminuisce fino al 30-50% all'interno del latte, due settimane dopo il parto (Schollenberger *et al.*, 1986).

Dal punto di vista immunitario è essenziale sottolineare che, nel suinetto, sono in grado di attraversare la barriera intestinale solo i leucociti della propria madre e questo fenomeno viene definito "istocompatibilità". I leucociti provenienti da una scrofa estranea non riescono ad attraversare questa barriera e quindi non vengono trasmessi al suinetto (Tuboly *et al.*, 1988).

I leucociti vengono assunti dal suinetto al momento della suzione e migrano attraverso il sistema linfatico verso i linfonodi e i gangli mesenterici, la milza, le tonsille, i polmoni e il fegato. Iniziano a svolgere attività protettiva nei confronti di agenti patogeni partecipando all'immunità attiva cellulare come cellule presentanti l'antigene o come cellule della memoria (Suganuma *et al.*, 1986; Tuboly *et al.*, 1995).

E' bene ricordare poi che animali nati con un peso inferiore rispetto alla media trascorrono molto tempo a competere con i fratelli più pesanti per il consumo di alimento materno e di conseguenza assumono meno colostro (Milligan *et al.*, 2002).

Una valida alternativa per ridurre la mortalità è sicuramente rappresentata dal monitoraggio del parto e a seguire dei primi tre giorni di vita dei suinetti. Risulta certamente di aiuto identificare rapidamente i soggetti più deboli e/o sottopeso alla nascita per poterli supportare maggiormente e seguire in maniera più accurata.

Per i suddetti motivi è stato scelto di prestare particolare attenzione ad una fase delicata della vita dei suini, cioè ai primi giorni dopo il parto, quando il rischio di mortalità risulta più alto. Si è voluta approfondire l'importanza dell'assunzione del colostro da parte di animali ancora più a rischio di morte, i suinetti sottopeso. Inoltre è stata volutamente sottolineata l'importanza dell'assunzione del colostro della propria madre, che garantisce oltre al passaggio delle immunoglobuline (trasmesse anche dai colostri di altre scrofe), anche la trasmissione di leucociti attraverso il fenomeno di istocompatibilità.

Sono stati pertanto presi in considerazione diversi parametri zootecnici al fine di valutare l'esistenza di una correlazione tra la percentuale di mortalità sotto scrofa di suinetti sottopeso alla nascita ed il volume di colostro ingerito.

Obiettivo dello studio è stato quello di valutare diverse tecniche di colostratura in suinetti nati sottopeso confrontati ad un gruppo "gold standard" di soggetti di PV tra 1,5 Kg e 2 Kg alla nascita. Un ulteriore scopo dello studio è stato quello di evidenziare se le differenti metodiche di somministrazione del colostro influenzavano l'incremento di PV durante il periodo di lattazione (28 giorni) fino allo svezzamento, tenendo poi monitorati gli animali fino all'età di 10 settimane.

MATERIALI E METODI

L'allevamento in cui è stata eseguita la prova sperimentale è di 350 scrofe a ciclo semi-chiuso e condotto in banda trisettimanale con 7 bande a 28 giorni di lattazione. I parti vengono sincronizzati mediante il seguente protocollo di induzione: il giorno precedente al parto previsto sono somministrate due dosi di prostaglandine (PGF 2 α) (0,35 ml per somministrazione di Estrumate®-MSD Animal Health) distanziate di 6 ore (split dose), con la prima somministrazione alle ore 7.00. Il giorno del parto previsto, solo per quelle scrofe che non hanno ancora espulso nessun suinetto viene praticata una iniezione di ossitocina 14 UI (1,4 ml di Izossitocina®-Izo S.p.A.). Tutte le somministrazioni avvengono per via perianale.

Le sessioni di parti in cui è stata effettuata l'assistenza tecnica e durante le quali sono stati arruolati gli animali sono state cinque.

Durante le sessioni dei parti è stata effettuata la normale assistenza tecnica e contemporaneamente sono stati selezionati suinetti neonati sottopeso limitandosi però solo a quelli di peso vivo (PV) tra i 700 e i 1000 grammi alla nascita. Il motivo per cui non sono stati arruolati anche soggetti di peso inferiore ai 700 grammi ha trovato fondamento nella loro probabilità ancora più bassa di sopravvivenza (Mazzoni, 2007).

Oltre a questi animali è stato arruolato un ulteriore gruppo di soggetti di PV tra 1,5 kg e 2 kg ("gold standard") per permettere di confrontare durante tutta la durata della prova le differenze di PV tra i vari gruppi.

All'inizio della giornata dei parti, immediatamente dopo l'iniezione di ossitocina, sono state munte tutte le scrofe in procinto di partorire e per ognuna sono stati prelevati almeno 100 ml di colostro, raccolti all'interno di Falcon sterili da 50 cc. Sono stati subito trascritti i numeri della marca auricolare della scrofa e quello della gabbia parto sulle Falcon, per permettere di distinguere in ogni momento l'animale da cui proveniva il colostro.

Al momento del parto gli animali presunti sottopeso sono stati pesati con una bilancina a display elettronico (Rapala® 50LB/25Kg digital scale/pesau digital) in grado di misurare fino ad un grammo (fig. 1 e 2) e prima dell'arruolamento vero e proprio nello studio sono stati sottoposti ad un test per evidenziare la presenza di vitalità (back test) (Forkman *et al.* 1995).



Fig. 1 e 2 Metodo di pesatura dei suinetti mediante bilancina a display elettronico.

Fig. 1 and 2 Weighing of the piglets through the use of an electronic scale.

I suinetti inseriti nel primo gruppo sono stati immediatamente tolti dalla madre, prima ancora di potersi alimentare. A questi è stata applicata una marca auricolare numerata per conigli di colore giallo (fig. 3 e 4) e sono stati messi sotto una lampada a infrarossi in una nursery preparata precedentemente con abbondante carta e perfosfato (fig. 5). Gli animali appartenenti a questo gruppo sono stati alimentati durante la durata della prova con il colostro della propria madre raccolto precedentemente secondo le modalità esposte in seguito, fino a raggiungere la quantità di 100 mg/kg PV nell'arco di 36 ore dalla nascita (Le Treut, 2011).



Fig. 3 e 4 Apposizione delle navette auricolari per conigli sui suinetti sottopeso ai fini di identificare il gruppo di appartenenza.

Fig. 5 Suinetti sottopeso all'interno della nursery messi sotto una lampada a raggi infrarossi.

Fig. 3 and 4 Apposition of the ear tags on the underweight piglets in order to identify their group belonging.

Fig. 5 Underweight piglets inside the nursery box under an infrared lamp.

I suinetti inseriti nel secondo gruppo sono stati ugualmente tolti dalla madre prima di potersi alimentare. A questi è stata applicata una marca auricolare numerata per conigli di colore azzurro e sono stati messi sotto una lampada a infrarossi in una nursery preparata precedentemente con abbondante carta e perfosfato. Gli animali appartenenti a questo gruppo sono stati alimentati, lungo la prova, secondo le modalità esposte in seguito con un pool di colostri raccolti dalle scrofe che avevano partorito tre settimane prima, mantenuto ad

una temperatura di congelamento e fatto scongelare a bagno maria la mattina dei parti. La quantità di colostro fornita a questi animali è stata pari a 80-100 mg/kg PV nell'arco di 36 ore dalla nascita (Le Treut, 2011).

I suinetti inseriti nel terzo gruppo sono stati lasciati sotto la propria madre, garantendo loro la possibilità di alimentarsi in modo naturale. A questi è stata applicata una marca auricolare numerata per conigli di colore arancione. Questo gruppo è stato scelto come gruppo controllo. Agli animali appartenenti al gruppo "gold standard" (gruppo 4) è stata applicata una marca auricolare numerata per conigli di colore bianco.

I dati degli animali alla nascita sono stati tutti trascritti su schede di colori diversi a seconda del gruppo di appartenenza.

Una volta che gli animali sono stati arruolati nel proprio gruppo, ad eccezione del gruppo controllo (gruppo 3), che è stato lasciato sotto le proprie madri fino al pomeriggio, i suinetti del gruppo 1 e del gruppo 2, divisi nelle rispettive nursery, sono stati colostrati mediante l'ausilio di un sondino esofageo inserito per via oro-faringea (figura 6). Il sondino utilizzato, di piccolo calibro e flessibile, è stato fissato ad una siringa usa e getta senza ago da 10 cc precedentemente riempita di colostro. Tenendo la bocca del suinetto aperta il sondino è stato fatto scivolare sul palato e, spingendo delicatamente verso l'alto, è stato fatto passare nella porzione più prossimale dell'esofago. Dopo aver accertato che il neonato respirasse e non emettesse rantoli (indicando una errata collocazione del sondino all'interno della trachea) è stato spinto delicatamente il colostro contenuto nella siringa direttamente nello stomaco del suinetto (Mazzoni, 2007).



Fig. 6 Colostratura mediante utilizzo di sondino oro faringeo.

Fig. 6 Artificial administration of colostrum with the use of a probe.

I suinetti appartenenti al gruppo 1 sono stati alimentati, una volta asciutti, somministrando una quantità iniziale di 10 cc di colostro munto dalle proprie madri e mantenuto alla temperatura presente sotto la lampada UV. In seguito sono stati somministrati 10 cc di colostro ad intervalli di circa un'ora, fino a raggiungere la quantità finale di 100 mg/kg PV nell'arco di 24 ore, al fine di garantire il passaggio dei linfociti materni attraverso il fenomeno di istocompatibilità (Salmon *et al.*, 2010; Tuboly *et al.*, 1988; Le Treut, 2011). I suinetti appartenenti al gruppo 2 sono stati alimentati, una volta asciutti, somministrando

una quantità iniziale di 10 cc di colostro prelevato da un pool di colostri di tre settimane prima, mantenuto alla temperatura presente sotto la lampada a infrarossi. In seguito sono stati somministrati 10 cc di colostro ad intervalli di circa un'ora, fino a raggiungere la quantità finale per animale di 80-100 mg/kg PV nell'arco di 24 ore al fine di garantire una buona protezione immunitaria (Le Treut, 2011).

I suinetti appartenenti al gruppo 3 sono stati lasciati naturalmente sotto scrofa, così come quelli del gruppo 4. Il numero di soggetti arruolati nei diversi gruppi è variato in base alle nascite per ogni sessione di parti.

Durante il pomeriggio, alla fine dell'assistenza ai parti, tutti i sottopeso selezionati sono stati messi sotto una scrofa di balia attraverso il meccanismo dell'adozione precoce o cross fostering. Per garantire uniformità di taglia nella covata della balia sono stati assegnati al massimo 12 dei suinetti inclusi nella prova, aventi un peso il più omogeneo possibile. Pertanto i suinetti sono stati mescolati indipendentemente dal gruppo di appartenenza, e lasciati così liberi di alimentarsi e fidelizzarsi secondo le proprie attitudini.

Gli animali sono stati monitorati fino all'età dello svezzamento (28 giorni) e successivamente a 10 settimane di vita. Durante tutta la durata della prova sono stati annotati gli eventuali decessi e le patologie intercorse.

La valutazione del PV dei suinetti è stata effettuata il giorno del parto, identificato come giorno 0, il giorno 1 (1), il giorno 5 (2), il giorno 28 (3) ed il giorno 70 (4) e i pesi sono stati riportati sulle schede dei differenti colori esposte in precedenza.

Per quello che riguarda l'analisi statistica, le differenze tra i pesi nei 4 gruppi a confronto ad ogni intervallo di tempo prestabilito sono state confrontate tramite test ANOVA ad una via, previo controllo della normalità delle distribuzioni di dati a confronto.

Il livello di significatività è stato posto uguale a $p < 0.05$.

Le differenze nelle frequenze di mortalità rilevata tra i 4 gruppi a confronto, dalla nascita allo svezzamento e successivamente alle 10 settimane di vita, sono state confrontate con il test esatto di Fisher, con $p < 0.05$.

RISULTATI

Al termine della prova sono stati arruolati 26 animali nel gruppo 1, 30 animali nel gruppo 2 e 33 animali nel gruppo 3 per un totale di 89 suinetti sottopeso e 47 animali normopeso nel gruppo 4.

Nessuno dei suinetti inclusi nella prova durante il periodo della lattazione ha manifestato segni clinici di patologia. Tuttavia a causa di schiacciamento da parte della scrofa sono deceduti 4 animali appartenenti al gruppo 2, 3 animali appartenenti al gruppo 3 e 3 animali appartenenti al gruppo 4. Nessun animale del gruppo 1 è deceduto durante le quattro settimane di lattazione. Nelle sei settimane successive allo svezzamento sono deceduti un totale di 2 animali appartenenti al gruppo 1, 2 al gruppo 2, 3 al gruppo 3 e nessuno appartenente al gruppo 4. Per questi animali non è stata prevista un'indagine necroscopica.

Le medie dei PV dei suinetti appartenenti ai diversi gruppi, realizzate nelle diverse fasi della prova, sono riassunte nella seguente tabella (tabella 1).

Tabella 1. Medie dei PV dei suinetti appartenenti ai quattro gruppi durante le diverse fasi della prova

Table 1. Average BW of the piglets belonging to the four groups on the different days of evaluation

PV MEDI AI DIVERSI GIORNI DI DETERMINAZIONE (espressi in grammi)					
	Giorno 0	Giorno 1	Giorno 5	Giorno 28	Giorno 70
Gruppo 1	888,46	940,38	1332,69	5842,31	19329,17
Gruppo 2	885,77	937,31	1411,92	6296,15	18500
Gruppo 3	863,66	964,00	1404,33	5746,67	18488,89
Gruppo 4	1665,91	1790,67	2376,89	7753,04	23152,27

Dall'analisi statistica dei dati raccolti è emerso che non esiste alcuna differenza statisticamente significativa per tutti i tempi considerati tra i gruppi 1, 2 e 3 (confrontandoli singolarmente uno ad uno) per quanto riguarda l'incremento di PV.

Al contrario in tutti i tempi considerati esiste sempre una differenza statisticamente significativa tra il gruppo 4 e gli altri tre gruppi ($p < 0,01$) per quanto riguarda l'incremento di PV.

Inoltre confrontando i 4 gruppi è emerso che non esiste alcuna differenza significativa per quello che riguarda l'indice di mortalità a diversi tempi considerati, dove le perdite contemplano sia i morti che gli scarti.

L'incremento di PV dei suinetti appartenenti ai diversi gruppo è evidenziato nel seguente grafico (grafico 1).

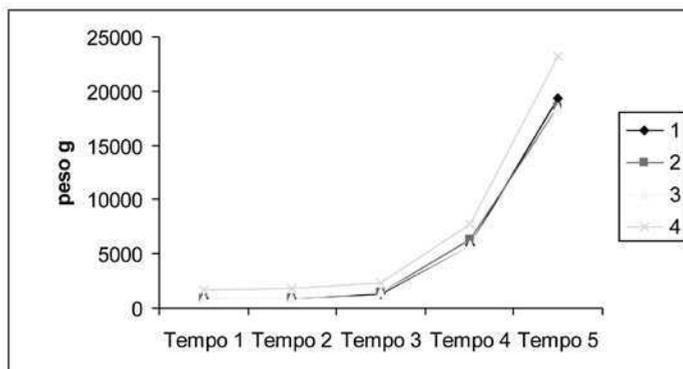


Grafico 1. Incremento di PV dei suinetti appartenenti ai diversi gruppi nei tempi considerati.

Graphic 1. Increase in the BW of the piglets belonging to the different groups at the considered stages

DISCUSSIONE

Dall'analisi dei dati è stato possibile evidenziare che non esistono differenze statisticamente significative relativamente all'incremento di peso vivo e all'indice di mortalità durante la lattazione e fino all'età di 10 settimane tra i primi tre gruppi di suinetti sottopeso arruolati

nella prova. Vale quindi la pena ricordare che il fatto di alimentare forzatamente i suinetti con il colostro materno (gruppo 1), non conferisce un vantaggio zootecnico reale rispetto ai suinetti alimentati forzatamente con un pool di colostri (gruppo 2) oppure rispetto a quelli lasciati a nutrirsi sotto le proprie madri (gruppo 3).

CONCLUSIONI

Sembra che la chiave di volta per il recupero dei sottopeso sia più probabilmente da ricercare nella corretta scelta della scrofa di balia piuttosto che non nella scelta di colostrare forzatamente questi suinetti. La forma dei capezzoli, l'altezza dal pavimento delle due linee mammarie e la distanza fra le stesse, ricoprono un ruolo decisivo nella scelta della scrofa a cui affidare i suinetti sottopeso. Un'altra caratteristica da tenere ben presente quando si effettua la scelta della balia è l'ordine di parto di quest'ultima, che dovrebbe preferibilmente essere secondipara. Il motivo di tale scelta è da ricercare nel fatto che, oltre ad essere solitamente una buona lattifera, è un animale già abituato alle strutture della sala parto e presenta una ghiandola mammaria già attivata da una precedente lattazione. Nell'allevamento in cui è stato condotto lo studio sperimentale i parti sono abitualmente indotti, per cui è possibile sostenere che, nelle aziende in cui viene praticata tale metodica zootecnica, la somministrazione forzata di colostro potrebbe essere rivista, in quanto è stato dimostrato che lo spostamento dei suinetti durante la fase colostrale da una scrofa ad un'altra nella stessa fase, risulta sufficiente per garantire una protezione adeguata, senza incidere sulla mortalità e sull'incremento del peso vivo. Inoltre si può sostenere che, per il mantenimento dei parametri zootecnici dei suinetti, non è necessario il colostro materno, ma può bastare quello proveniente da altre scrofe, bypassando quindi la problematica inerente al passaggio di leucociti dalla madre alla propria nidia.

Certamente le condizioni sanitarie ed il management aziendale (per esempio la banda trisettimanale) possono giocare un ruolo decisivo, ma rimane che, in base ai dati raccolti, non è stato possibile relazionare il fenomeno dell'istocompatibilità con la produttività zootecnica dei suinetti in sala parto e negli svezzamenti fino a 10 settimane di vita, poiché non sono state visualizzate differenze statisticamente significative nel confronto tra gli accrescimenti dei tre diversi gruppi e tra gli indici di mortalità.

Eeguire l'assistenza in sala parto alla mattina ed effettuare le adozioni nel pomeriggio potrebbe non essere un errore zootecnico, nonostante diversi autori sostengano che i suinetti debbano restare sotto la propria madre almeno 24 ore, per ricevere un'adeguata colostratura.

Analizzando i nostri dati è infatti possibile sostenere che, se i suinetti vengono spostati ancora durante la fase di colostratura, per esempio nel pomeriggio, quando una parte di loro (gli ultimi nati) non ha ancora assunto una adeguata quantità di colostro materno, non vengono rilevate differenze significative nell'incremento di peso vivo allo svezzamento o nell'indice di mortalità né durante la lattazione né a 10 settimane dalla nascita.

Questo concetto trova una possibile relazione nel fatto che i suinetti vengano trasferiti sotto una scrofa nella stessa fase colostrale della propria madre d'origine.

Oltre alla scelta della balia, assume poi una grande importanza la capacità della scrofa nel trasmettere anticorpi al suinetto tramite il colostro. Nella pratica buiatrica ben nota è l'esecuzione di esami su siero di vitello volti alla determinazione di anticorpi trasmessi tramite il colostro dalla madre. Una mancanza o carenza di immunoglobuline colostrali, definita failure of passive transfer (FPT), viene considerata predisponente per la cosiddetta sindrome delle enteriti neonatali del vitello. Da qui si evince che la gestione dell'FPT potrebbe essere applicata anche per la scrofa. Il concetto dell'FPT e la sua diagnosi in azienda potrebbero giustificare l'esistenza di una "banca del colostro" d'allevamento. Da questa si potrebbero attingere adeguati quantitativi dello stesso per fronteggiare problematiche quali le mastiti e l'ipogalassia transitoria post

partum, che sono potenzialmente coinvolte nella genesi del mancato trasferimento di anticorpi materni durante la colostratura.

Rimane difficile stabilire se sia più importante il ruolo di apportatore di energia del colostro, piuttosto che di fonte primaria di anticorpi per il suinetto. E' molto probabile che entrambi risultino rilevanti, ma è nostra opinione che, almeno nelle prime ore di vita, l'attività di vero e proprio carburante svolta da questo alimento sia preponderante.

Questa considerazione potrebbe superare il fatto che il colostro provenga da madre naturale piuttosto che adottiva. Tuttavia ci saremmo aspettati prestazioni zootecniche inferiori alle 10 settimane di vita nel gruppo colostrato con il pool di colostri, questo in virtù di una probabile minore efficienza dell'apparato immunitario, visto il mancato rispetto del fenomeno di istocompatibilità. Una possibile spiegazione di questo fatto potrebbe essere ricercato nel "fattore aziendale". La banda trisettimanale infatti, a causa della diversa gestione degli spazi innalza gli standard sanitari aziendali attraverso una riduzione della carica batterica ambientale e flussi di animali non continui.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso-Spilsbury M., Ramírez-Necoechea R., González-Lozano M., Mota-Rojas D., Trujillo-Ortega M. E. (2007) "Piglet survival in early lactation: a review". *J Anim Vet Adv.* 6(1): 76-86.
2. Dick G. W., Swierstra E. E. (1987) "Causes of piglet death from birth to weaning". *Can J Anim Sci.* 67: 543-547.
3. Edwards S. A. (2002) "Perinatal mortality in the pig: environmental or physiological solutions?". *Livest Prod Sci.* 78, 3-12.
4. Forkman B., Furuhaug I. L., Jensen P. (1995) "Personality, coping patterns and aggression in piglets". *Appl Anim Behav Sci.* 45, 31-42
4. Le Dividich J., Rooke J. A., Herpin P. (2005) "Nutritional and immunological importance of colostrum for the new-born pig". *J Agr Sci.* 143, 469-485.
5. Le Treut Y. (2011) "Conoscere e gestire il colostro: un'opportunità per svezzare un suinetto in più", intervento personale, 11 ottobre 2011, Mantova, presso Gruppo Veterinario Suinicolo Mantovano.
6. Mazzoni C. (2007) "La gestione della sala parto", I manuali pratici di professione suinicoltore, 1a ed., Le Point Veterinaire Italie.
7. Milligan B. N., Dewey C. E., De Graw A. F. (2002) "Neonatal-piglet weight variation and its relation to pre-weaning mortality and weight gain on commercial farms". *Prev Vet Med.* 56, 119-127.
8. Salmon H., Berri M., Meurens F. (2010) "Immunité maternelle colostrale et lactée: facteurs humoraux et cellulaires d'induction et de transmission au porcelet jusqu'au sevrage". *Journées Recherche Porcine.* 241, 241-250.
9. Suganuma A., Ishizuka A., Sakiyama Y., Maede Y., Namioka S. B. (1986) "Lymphocyte differentiation and suppressor activity by T lymphocytes derived from neonatal and suckling piglets". *Res Vet Sci.* 40, 400-405.
10. Tuboly S., Bernath S., Glavits R., Medveczky I. (1988) "Intestinal absorption of colostrum lymphoid cells in newborn piglets". *Vet Immunol Immunopathol.* 20, 75-85.
11. Tuboly S., Bernath S., Glavits R., Kovacs A., Megyeri Z. (1995) "Intestinal absorption of colostrum lymphocytes in newborn lambs and their role in the development of immune status". *Acta Vet Hung.* 43, 105-115.
12. Tuchscherer M., Puppe B., Tuchscherer A., Tiemann U. (2000) "Early identification of neonates at risk: traits of newborn piglets with respect to survival". *Theriogenology.* 54, 371-388.

RIFORMA DELLE SCROFE ENTRO IL 3° PARTO: ANALISI ECONOMICA

SOWS REPLACEMENT UNTIL THE 3RD PARITY: ECONOMIC ANALYSIS

SALVINI, F., GUADAGNINI, G., BRESAOLA, M.

Pig Vet, Brescia

Parole chiave: scrofette, rimonta, 3° gestazione, perdita economica

Key words: gilts, replacement, 3rd parity, economic losses

RIASSUNTO:

Molti parametri produttivi hanno un'importanza economica ben nota in un allevamento di suini. Altri aspetti, spesso di minor impatto, vengono invece talvolta trascurati ma se sommati fra loro possono incidere fortemente sulla redditività aziendale. Scopo del lavoro è analizzare da un punto di vista economico come una riforma delle scrofe entro la 3° gestazione, superiore al normale, possa incidere sul bilancio aziendale.

SUMMARY:

In a pig farm the most productive parameters and their economic importance are well known. Other aspects, with less importance, are often unconsidered. Otherwise the addition of these aspects can have a strong impact on farm profitability. The aim of this study is to analyze the economic importance of the sows reform until the 3rd parity and how a larger reform than normal until 3rd parity can affect the economic budget.

Many production parameters have significant economic well known in a pig farm. Other aspects with less of an impact are often overlooked, but if added together can have a strong impact on farm profitability. The aim of the study is to analyze an economic point of view as a percent of reform of sows up until the 3rd gestation, more than normal affect the economic balance.

INTRODUZIONE:

I parametri economico-produttivi valutati in un'azienda suinicola sono normalmente quelli più convenzionali e soprattutto quelli più facilmente analizzabili. Fare per esempio una valutazione economica circa il numero di suinetti svezzati, o il costo di un giorno improduttivo è, nella maggioranza dei casi, un lavoro relativamente semplice e di facile determinazione. All'interno di un bilancio aziendale, ci sono molte voci "minori" difficilmente considerate ed analizzate, che possono però avere un'incidenza notevole sull'andamento dell'azienda, sia da un punto di vista produttivo che economico.

Uno di questi parametri è la percentuale di scrofe eliminate entro il terzo parto: scopo di questo lavoro è di valutare questo aspetto, cercando di quantificare da un punto di vista economico quanto il solo costo "genetico" possa influire sul bilancio aziendale.

E' facile immaginare che l'acquisto o l'autoproduzione di scrofette ha dei costi notevoli: il diverso accrescimento, una alimentazione differente, un maggior costo di "gestione", vaccinazioni e, non ultimo un costo rilevante riferibile al valore genetico. Questo costo aggiuntivo andrebbe "ammortizzato" per tutta la carriera dell'animale e quindi "spalmato"

su più gestazioni, su più parti, su più suinetti nati e quindi svezzati. E' evidente immaginare come la perdita di un animale nella fase iniziale della sua vita riproduttiva abbia un impatto notevole sui costi aziendali; al contrario l'eliminazione di una scrofa a fine carriera, in cui il "costo genetico" è già stato ammortizzato, ha una minor incidenza sul bilancio aziendale. Il costo di una scrofa, sia essa produttiva o non produttiva, è indicativamente di 900-1000 euro all'anno, pari a circa 2,5- 2,7 euro al giorno. Tali costi possono indicativamente essere divisi in costi espliciti e impliciti. I primi riguardano i costi direttamente legati alla produzione, mentre i secondi sono costi indipendenti dall'aspetto produttivo. In Tab 1 sono indicate le principali voci di costi espliciti ed impliciti.

Tab 1 distribuzione percentuale del costo di una scrofa

Tab 1 Percentage distribution of the sow 's costs

COSTI ESPlicitI		COSTI IMPLICITI	
	% SUL COSTO TOTALE		% SUL COSTO TOTALE
ALIMENTAZIONE	42	COSTI FINANZIARI	13
LAVORO	13	ALTRO	19
FARMACI	10		
FECONDAZIONE	3		

Indipendentemente dal costo giornaliero di una scrofa, la perdita involontaria di una gravidanza comporta una serie di costi , soprattutto riferibili al mancato guadagno che questo evento può determinare. Anche in questo caso tali costi possono essere divisi in costi "diretti" ed in costi "indiretti", come evidenziato in Tab 2.

Tab 2 suddivisione dei costi diretti ed indiretti

Tab 2 subdivision of the direct and indirect costs

COSTI DIRETTI	COSTI INDIRETTI
SUINETTI PERSI	MANO D'OPERA
AUMENTO GIORNI IMPRODUTTIVI	COSTO ALIMENTAZIONE
COSTO FECONDAZIONE	VACCINAZIONI
COSTO GENETICO	COSTI FINANZIARI
	ALTRI COSTI (elettricità, smaltimento,...)

La valutazione economica dei costi diretti è relativamente facile ed immediata, come proposto in Tab 3, al contrario la valorizzazione dei costi indiretti può essere raggiunta solo in aziende che hanno una attenta raccolta dei dati economici aziendali.

Tab 3 valutazione economica dei costi diretti**Tab 3** economic evaluation of direct costs

PARAMETRO	DATO	VALORE SINGOLO	TOTALE PERDITA
Perdita suinetti	10 suinetti	35	350
> gg improduttivi	70 giorni	2,6	182
Costo fecondazione	2,3 interventi	5	11.5
TOTALE			543.5

Da quanto sopra si può dedurre come l'eliminazione di una scrofa al 70° giorno di gravidanza possa rappresentare una perdita economica diretta di circa 550 euro, cui vanno poi sommate le perdite indirette che un calo di produzione può comportare. Se alla perdita di gravidanza si associa anche l'eliminazione della scrofa, il costo diretto riferito al "costo genetico" aumenta ulteriormente. Di seguito valuteremo solo l'incidenza di costi, che l'eliminazione di una scrofa entro la 3° gestazione può determinare, indipendentemente dalla mancata produzione. La "demografia" di una azienda con un buon livello produttivo, deve rispettare dei valori standard (Bertacchini-Campani "Manuale di allevamento suino"), come riportato in Tab. 4

Tab 4 distribuzione % ottimale della demografia aziendale**Tab 4** distribution % of demography

DEMOGRAFIA AZIENDALE							
1	2	3	4	5	6	7	>7
20%	16%	15%	13%	12%	10%	8%	6%

Il numero di scrofette e scrofe entro le prime 3 gestazioni dovrebbe rappresentare circa il 50% del totale delle scrofe presenti. La percentuale di riforma può variare da un 40 ad un 50% anno, e questa percentuale è anche influenzata dal numero di animali "giovani", che vengono riformati. E' chiaro che, in linea del tutto teorica, la riforma ottimale andrebbe realizzata su animali "vecchi" e non in una fase produttiva attiva, ma purtroppo non sempre è così, e la bravura dell'allevatore sta anche nel saper gestire al meglio i giovani riproduttori, in modo tale da poter garantire la massima longevità produttiva.

Non esistono in bibliografia dati certi circa la distribuzione percentuale di eliminazione

delle scrofe in base al numero di parti. Dall'analisi aziendale effettuata presso nostri clienti emerge come, una buona gestione, possa portare, sul totale delle scrofe eliminate, ad un massimo del 25% di scrofe eliminate durante le prime 3 gestazioni, ancora un 25% fra la 4° e la 7° gestazione ed il 50% circa su scrofe oltre il 7° parto. Questo ovviamente laddove l'obiettivo di riforma è rappresentato dal 7° parto.

MATERIALI E METODI

Vengono prese in esame 2 aziende del nord Italia, entrambe di circa 550 scrofe presenti, aventi parametri produttivi e sanitari paragonabili. I due allevamenti, un ciclo aperto ed un ciclo chiuso, hanno una gestione della rimonta molto simile: entrambe le aziende rimontano con scrofette di provenienza esterna, del peso variabile fra i 6 ed i 30 kg. Le scrofette, provenienti da 2 diverse case genetiche, sierologicamente negative per PRRSv al momento della consegna, vengono successivamente portate in strutture separate ma comunque interne all'allevamento, e qui vengono acclimatate, accresciute e sottoposte a tutti gli interventi vaccinali previsti dai protocolli sanitari aziendali. Successivamente, prima dell'inserimento in scrofaia, viene eseguito un monitoraggio sierologico e virologico e, se i dati analitici corrispondono a quanto richiesto, spostate in gestazione per la stimolazione e fecondazione.

Nel corso del 2011, l'analisi dei dati aziendali ha messo in evidenza come in una delle due aziende (AZIENDA B), il numero di scrofe eliminate entro il terzo parto fosse decisamente superiore rispetto alla AZIENDA A.

Come già detto non esistono in bibliografia riferimenti certi circa la percentuale di scrofe giovani eliminate, però dalla continua osservazione di dati di allevamento, è plausibile considerare che massimo il 25% di tutte le scrofe eliminate sia compreso entro la 3° gestazione. Tale percentuale comprende le scrofette dal momento della fecondazione e tutte le scrofe fino al 3° parto. Si tratta ovviamente sia di riforme volontarie che involontarie, e quindi sia nel corso della gravidanza che non.

Tab 5 % teorica di scrofe eliminate per ordine di parto

Tab 5 theoretical % of sows eliminated for parity

% DI ELIMINAZIONE TEORICA DELLE SCROFE IN BASE AL NUMERO DI PARTI										
N° PARTI	0	1	2	3	4	5	6	7	>7	
% ELIM	22-25%			25-28%						50%

RISULTATI

Per una più semplice analisi dell'incidenza sul costo aziendale, è stato considerato un unico "costo genetico", uniformandolo in entrambe le aziende a 100 euro per scrofa fecondata. Si è ipotizzato di "spalmare" tale costo su un ipotetico numero di suinetti svezzati nel corso della vita riproduttiva della scrofa, come evidenziato in Tab 6

Tab 6 incidenza del “costo genetico” in base al numero di suinetti svezzati

Tab 6 ratio of the “genetic cost” based on the number of piglets weaned

NUMERO PARTI	TOT SUINETTI SVEZZATI	COSTO “GENETICO” PER SUINETTO SVEZZATO €	VALORE RESIDUO DEL COSTO “GENETICO” €
0	0	100	100
1	10	10	86
2	20	5	72
3	30	3,3	58
4	40	2,5	44
5	50	2	30
6	60	1,6	16
7	70	1,4	0

Da quanto riportato in Tab 6, si nota come il costo “genetico” per capo svezzato passa da 10 € se la scrofa viene eliminata dopo il primo parto e cioè dopo aver svezzato 10 suinetti, fino ad arrivare a 1,4€ per suinetto svezzato se l’eliminazione avviene al 7° parto, dopo aver prodotto 70 suinetti.

Allo stesso modo “ammortizzando” il valore genetico dell’animale per i 7 parti, si evidenzia come ad ogni parto il valore residuo cala di 14 € (100€/7 parti= 14€)

Mantenendo tali valori, del tutto teorici, ma comunque molto vicini alla realtà, li abbiamo riportati nella pratica, applicandoli ai dati reali osservati nella azienda A e B nel corso del 2011.

In Tab 7 sono riportati i dati riassuntivi circa il numero e la percentuale delle scrofe eliminate per ordine di parti.

Tab 7 numero e percentuale di scrofe eliminate in base al numero di parti

Tab 7 number and percentage of sows eliminated according to the parities

	OrdineParto	1	2	3	4	5	6	7	>7	TOT	RIMONTA
AZ A	N° eliminate	26	13	13	9	5	20	24	124	234	42,5%
	% eliminate	11,1	5,5	5,5	3,9	2,2	8,6	10,2	53	100	
		22,2%			24,9%			53%			
AZ B	N° eliminate	56	25	24	11	16	22	28	98	280	50,9%
	% eliminate	20	8,9	8,6	3,9	5,7	7,9	10	35	100	
		37,5%			27,5%			35%			

Da quanto sopra si evidenzia una sostanziale differenza fra l’azienda A e l’azienda B circa il numero di scrofe eliminate entro il 3° parto: nell’azienda A corrisponde al 22,2% del totale delle scrofe eliminate, pari a 52 animali, mentre nella azienda B al 37,5% pari a 105 animali. Ovviamente un così alto numero di scrofe giovani eliminate, ha comportato da una parte un inevitabile invecchiamento della mandria, e dall’altra una percentuale maggiore di rimonta per poter mantenere invariato il numero di scrofe produttive.

In Tab 8 abbiamo provato a quantificare quanto questa differenza di scrofe eliminate possa aver inciso sul bilancio aziendale.

Tab 8 incidenza del “costo genetico” nelle 2 aziende

Tab 8 impact of “genetic cost” in two farms

N° GESTAZ		1	2	3	4	5	6	7	>7	TOT
AZ A	N° eliminate	26	13	13	9	5	20	24	124	234
	VALORE GENETICO RESIDUO €	100	86	72	58	44	30	16	0	
	COSTO TEORICO €	2600	1118	936	522	220	600	384	0	6380 €
AZ B	N° eliminate	56	25	24	11	16	22	28	98	280
	VALORE GENETICO RESIDUO €	100	86	72	58	44	30	16	0	
	COSTO TEORICO €	5600	2150	1728	638	704	660	448	0	11928 €

La differenza nel corso del 2011 fra le 2 aziende è stata, come facilmente ricavabile dai dati in Tab 8, di 5548€.

Inoltre, per mantenere lo stesso numero di riproduttori presenti in allevamento, l’Azienda B, ha dovuto acquistare 46 scrofette in più rispetto alla Azienda A. Tale maggiore rimonta, mantenendo lo stesso standard di valutazione utilizzato in precedenza, può essere quantificato sempre in 100€ per scroffetta acquistata, pari a 4600 euro in più all’anno.

Se a questa cifra sommiamo la precedente, il costo maggiore che l’azienda B ha dovuto sostenere è di 10148 euro/anno. Nel presente lavoro non è stato volutamente considerato l’aumento dei costi indiretti su cui questo parametro può incidere: ci riferiamo per esempio all’aumento dei giorni improduttivi, o al minor numero di suinetti svezzati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo scopo del lavoro è quello di quantificare in termini economici un parametro produttivo normalmente poco considerato, come la % di scrofe eliminate entro il 3° parto. E’ ovvio che all’interno di una azienda suinicola molti parametri hanno un’incidenza economica decisamente superiore all’aspetto considerato: basti pensare al numero di parti/scrofa/anno, o al numero di suinetti nati o svezzati, al numero di aborti o di scrofe vuote o ancora al numero di giorni improduttivi.

Ci sono però un gran numero di parametri zootecnici, spesso dimenticati o non considerati, ma in grado se sommati fra loro, di influenzare in modo significativo la redditività dell’azienda.

Dal confronto dei dati produttivi delle 2 aziende, è comunque emerso come una maggior riforma entro il 3° parto possa essere un parametro in grado di incidere notevolmente sul bilancio aziendale.

In particolare dall’analisi dei dati di 2 aziende del nord Italia è emerso come un aumento di 15 punti percentuali dell’eliminazione di scrofe “giovani”, possa portare ad una perdita di circa 10000 euro/anno, considerando il solo “costo genetico, e non tutti i costi relativi alla mancata produzione.

BIBLIOGRAFIA

Bertacchini F., Campani I. (2001) “Manuale di allevamento suino”

VALUTAZIONE DI DOLORE E STRESS DURANTE LA CASTRAZIONE DEI SUINETTI: ANALGESIA PREVENTIVA CON ACIDO TOLFENAMICO

ASSESSMENT OF PAIN AND STRESS DURING CASTRATION IN PIGLETS: PREVENTIVE ANALGESIA USING TOLFENAMIC ACID

LONARDI, C.¹, TONON, F.², MAZZONI, C.², ROSSI, M.³, GOTTARDO, F.¹, SCOLLO, A.^{1,2}

¹ Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università di Padova;

² SUIVET;

³ Vétroquinol Italia Corresponding author scollo@suivet.it

Parole chiave: castrazione, analgesia, suinetto, acido tolfenamico.

Key words: castration, analgesia, piglet, tolfenamic acid.

Riassunto

A causa della crescente pressione dell'opinione pubblica, la suinicoltura si sta orientando verso lo sviluppo di metodi alternativi alla castrazione chirurgica dei suineti. Scopo del presente lavoro è stato valutare, tramite indicatori comportamentali e fisiologici, l'efficacia della preventiva somministrazione di acido tolfenamico nel ridurre il dolore durante la castrazione. Sono rientrati nella prova 96 suineti maschi, divisi in 4 gruppi: solo manipolati (M), castrati senza analgesia (C), preventivamente trattati con acido tolfenamico (T), e preventivamente trattati con soluzione placebo (F). Il comportamento è stato osservato 15 minuti per 4 volte dopo la castrazione (0h00, 0h16, 1h00, 1h15). I campioni di sangue sono stati raccolti 0h30 e 4h00 dopo la castrazione per la valutazione dei livelli di cortisolo. I risultati hanno indicato differenze significative tra il gruppo H ed i gruppi C e P per tutti i parametri considerati ($P < 0,001$), con eccezione del cortisolo a 4h00 che è risultato essere simile. I comportamenti *cammina* e *stazione*, ed il cortisolo a 0h30, non hanno mostrato differenze significative tra il gruppo T ed il gruppo H ($P > 0,05$). Concludendo, la somministrazione di acido tolfenamico nei suineti prima della castrazione riduce le alterazioni di parametri comportamentali e fisiologici indicatori di dolore. I risultati suggeriscono che l'uso di acido tolfenamico può ridurre il dolore indotto dalla castrazione nei suineti, migliorandone lo stato di benessere.

Abstract

For the increasing animal welfare concerns and the public opinion pressure, alternative methods to surgical castration of piglets will have to be implemented. Aim of this study was to evaluate, by behavioural and physiological indicators, the effectiveness of tolfenamic acid administered before castration to alleviate the pain. The study involved 96 male piglets, divided into 4 groups: handled only (M), castrated without analgesia (C), treated with tolfenamic acid before castration (T), and treated with placebo before castration (F). Behaviour was observed for 15 minutes at 4 time point from castration (0h00, 0h16, 1h00, 1h15). Blood samples were collected 0h30 and 4h00 after castration for cortisol concentration. Results showed significant differences for all the parameters in H group compared to C and P groups ($P < 0,001$), excluding cortisol level at 4h00 which was similar

in each group. Behaviours such as *walking* and *standing*, and cortisol at 0h30, showed no significant difference between T group and H group ($P > 0,05$). In conclusion, administration of tolfenamic acid before castration reduces alterations in behavioural and physiological indicators of pain in piglets. The findings suggest that tolfenamic acid could decrease the pain induced by castration in piglets, improving the welfare of piglets in practice.

INTRODUZIONE

Le pressioni sociali di un consumatore sempre più attento ed esigente sono in crescita, e la castrazione chirurgica del suino è tra gli argomenti che suscitano maggiore interesse. Annualmente circa 100 milioni di suini vengono castrati nell'Unione Europea, per la maggior parte senza l'ausilio di anestesia o analgesia (Fredriksen et al., 2009), ma la sostenibilità del metodo fino ad ora utilizzato è largamente messa in discussione per il futuro (de Roest et al., 2009) a causa delle ripercussioni di carattere etico sull'opinione pubblica. A tal proposito alcuni Paesi europei, come Norvegia, Svizzera e Olanda, hanno già introdotto l'obbligo di utilizzare anestesia locale o generale per gli animali destinati al commercio interno (Tuytens et al., 2012).

La ricerca in campo suinicolo si sta dunque orientando verso l'individuazione di metodi alternativi in grado di ridurre il dolore della castrazione. Sebbene la quantificazione del dolore sia talvolta difficilmente oggettivabile e priva di parametri specifici (Hansson et al., 2011), le alterazioni comportamentali (McGlone and Hellman, 1988; Taylor et al., 2001; Moya et al., 2008) e fisiologiche (White et al., 1995; Prunier et al., 2005; Carroll et al., 2006) registrate durante l'intervento suggeriscono alti livelli di stress acuto che si protraggono almeno fino alle successive 24 ore (Haya et al., 2003).

Tra le soluzioni possibili, attualmente vi sono la castrazione con l'utilizzo di anestesia (locale o generale) e/o analgesia, l'immunocastrazione e l'allevamento dei maschi interi. Tralasciando quest'ultima possibilità, adottata per lo più nei Paesi del nord Europa che producono il suino leggero e difficilmente applicabile al suino pesante, le diverse alternative presentano i loro pro e contro e nessuna sembra rappresentare la soluzione perfetta (Fredriksen et al., 2011), sottolineando la necessità di ulteriori studi.

Nel tentativo di approfondire le conoscenze in ambito di analgesia durante la castrazione del suinetto, il presente lavoro ha il fine di verificare l'effetto dell'acido tolfenamico somministrato prima della castrazione quale principio attivo tra i meno indagati allo scopo. Indicatori comportamentali e fisiologici sono stati utilizzati per la valutazione del dolore.

MATERIALI E METODI

Animali

La prova ha coinvolto 96 suinetti nati da 24 scrofe di genetica Goland. Per l'identificazione individuale degli animali, un'ora prima dell'inizio della prova ciascun suinetto è stato numerato in ordine progressivo sul dorso con un apposito pennarello. Tutti i soggetti avevano età compresa tra i 5 ed i 6 giorni e peso medio di $2,1 \pm 0,4$ kg. L'iniezione di Ferro ed il taglio della coda sono stati effettuati al termine della prova, in modo da evitare qualsiasi influenza con i parametri valutati.

Trattamenti

I suinetti sono stati suddivisi in 4 gruppi di trattamento, ciascuno rappresentato da 24 soggetti equamente distribuiti tra le 24 scrofe, tale per cui ciascuna nidiata aveva all'interno 1 soggetto per ciascun trattamento per eliminare l'effetto nidiata.

- C: Castrazione convenzionale. Non è stato utilizzato alcun farmaco pre-intervento;
- M: Manipolazione. È stata effettuata la stessa manualità della castrazione con uguali tempistiche, senza tuttavia procedere all'incisione dei tessuti né all'asportazione dei testicoli;
- T: Tolfedine cs. Sono stati somministrati per via intramuscolare con ago da insulina 2 mg/kg di acido tolfenamico (Tolfedine cs) a ciascun soggetto 1 ora prima della castrazione, pari a 0,05 ml/kg;
- F: Fisiologica. Sono stati somministrati per via intramuscolare con ago da insulina 0,05 ml/kg di soluzione fisiologica a ciascun soggetto 1 ora prima della castrazione.

Il contenimento dei suinetti, la castrazione e l'eventuale iniezione pre-intervento sono stati effettuati sempre dallo stesso operatore.

Rilevazioni

Tutti i suinetti sono stati pesati individualmente prima della castrazione per calcolarne la giusta dose di Tolfedine cs e assicurarsi che tutti fossero di peso compreso tra 1,7 e 2,5 kg.

Per evitare qualsiasi influenza tra le tipologie di dati raccolti, la totalità dei suinetti è stata suddivisa in 2 gruppi di 48 soggetti ciascuno (n = 12 per ciascun trattamento).

Il primo gruppo è stato sottoposto a 4 osservazioni comportamentali dirette post-intervento, ciascuna della durata di 15 minuti e con inizio dopo 0h00, 0h16, 1h00, 1h15 dopo la castrazione. Le osservazioni sono state effettuate da 2 operatori preventivamente formati con il metodo scan sampling (scan = 1 minuto), che indicavano in quale dei comportamenti indicati in Tabella 1 fosse impegnato ciascun suinetto.

Comportamento rilevato	Descrizione
Cammina	Il suinetto si sposta camminando
Stazione	Il suinetto resta fermo in piedi
Disteso	Il suinetto si trova in decubito laterale o sternale
Poppata	Il suinetto si alimenta al capezzolo della madre
Seduto	Il suinetto resta fermo seduto
Nido	Il suinetto si trova nel nido
Isolato	Il suinetto si trova solo e lontano dai fratelli
Dolorante	Il suinetto ha manifestazioni di dolore: tremori, grattamenti, agitazione della coda.

Tabella 1. Comportamenti rilevati durante le osservazioni e loro descrizione.

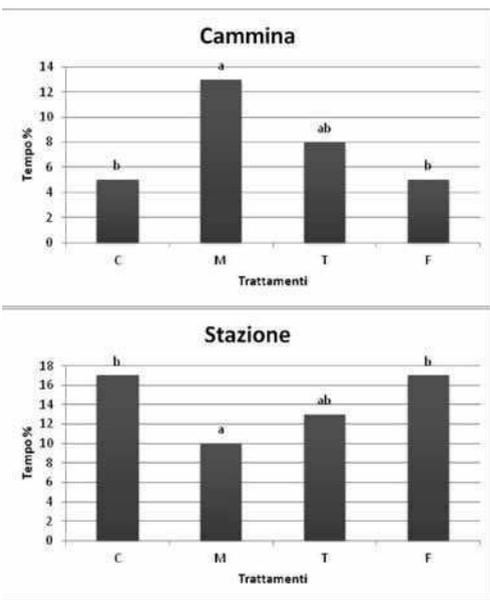
Negli stessi soggetti sono stati registrati posture e atteggiamenti antalgici a 0h30 e 1h30: cifosi, arti sotto di sé, mancato o non completo appoggio di un arto e coda flessa tra i posteriori. Nel secondo gruppo di prova sono stati invece effettuati 2 prelievi di sangue individuali a 0h30 e 4h00. I campioni sono stati immediatamente refrigerati fino al rapido arrivo al laboratorio, dove sono stati processati per la quantificazione del cortisolo sierico.

Analisi statistica

I dati sono stati inizialmente analizzati per valutarne la loro distribuzione Gaussiana tramite una PROC UNIVARIATE (SAS 9.2). Il cortisolo è risultato essere l'unica variabile con distribuzione non normale, dunque è stato corretto con una trasformazione logaritmica. I dati sono stati poi processati statisticamente con una PROC MIXED (SAS 9.2) valutando gli effetti dei 4 trattamenti, dei 4 diversi intervalli di osservazione e delle loro interazioni. Le medie sono state comparate utilizzando il test di Bonferroni.

RISULTATI

I comportamenti che si sono dimostrati essere maggiormente variabili tra un trattamento e l'altro sono stati *cammina* e *stazione*. Per tutti gli altri non si sono invece registrate significatività statistiche. Il gruppo dei manipolati (M) ha manifestato maggiore attività di deambulazione rispetto sia al gruppo dei castrati convenzionali (C) ($P < 0,001$) che dei suinetti con preventiva somministrazione di soluzione fisiologica (F) ($P < 0,01$). Il gruppo con Tolfedine (T) ha manifestato invece attività intermedia, risultando l'unico trattamento senza alcuna differenza statistica con i manipolati. Lo stesso risultato si è registrato per il comportamento di stazione: in questo caso il gruppo M ha impiegato una percentuale minore di tempo nel comportamento *stazione* rispetto ai gruppi C ($P < 0,001$) ed F ($P < 0,05$), senza alcuna differenza statistica invece con il gruppo T (Fig. 1).



La differenza significativa della percentuale di tempo impiegato dai suinetti nei comportamenti *cammina* e *stazione* tra il gruppo M ed i gruppi C ed F si è manifestata maggiormente durante il primo intervallo di osservazione (interazione trattamento x intervallo: $P < 0,01$). Anche in questo caso il gruppo T ha manifestato valori intermedi ma statisticamente paragonabili a quelli dei gruppi C ed F ($P > 0,05$).

A prescindere dal trattamento, la percentuale del tempo impiegato dai suinetti nei comportamenti *cammina*, *stazione*, *seduto* e *isolato* è stata molto elevata nei primi 15 minuti di osservazione (intervallo 1) per poi calare progressivamente nelle osservazioni successive ($P < 0,01$). Al contrario, il tempo registrato in *disteso* e *poppata* è aumentato ($P < 0,001$). Medie percentuali e significatività dei comportamenti sono riportate in Tabella 2.

Figura 1. Percentuale media del tempo impiegato dai suinetti nei comportamenti *cammina* e *stazione*.

Trattamenti: castrazione (C); manipolazione (M); Tolfedine (T); fisiologica (F).

^{a,b} Differenti lettere indicano differenze statistiche significative ($P < 0,05$).

Comportamento	Trattamento ¹					Intervallo di osservazione ²				
	C (%)	M (%)	T (%)	F (%)	SEM	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	SEM
Cammina	5 ^b	13 ^a	8 ^{ab}	5 ^b	1,73	16 ^a	4 ^b	3 ^b	8 ^b	1,62
Stazione	17 ^a	10 ^b	13 ^{ab}	17 ^a	1,76	36 ^a	6 ^b	9 ^b	5 ^b	1,67
Disteso	65	62	62	70	3,94	40 ^b	75 ^a	76 ^a	68 ^a	3,47
Poppata	9	14	14	7	2,37	4 ^b	13 ^a	10 ^{ab}	17 ^a	2,30
Seduto	3	2	2	2	0,76	4 ^a	2 ^b	1 ^b	2 ^{ab}	0,69
Nido	58	50	54	59	6,60	50	61	57	54	4,80
Isolato	6	2	0	4	1,63	6 ^a	4 ^{ab}	1 ^b	2 ^{ab}	1,34
Dolorante	2	0	0	0	1,06	1	1	0	0	0,81

Tabella 2. Percentuale media del tempo impiegato dai suinetti in ciascun comportamento, indicata per trattamento e per ciascun intervallo di osservazione.

¹ Trattamento: castrazione (C); manipolazione (M); Tolfedine (T); fisiologica (F).

² Intervallo di osservazione: 1 = da 0h00 a 0h15 minuti dopo l'intervento di castrazione; 2 = da 0h16 a 0h30 minuti dopo l'intervento di castrazione; 3 = da 1h00 a 1h15 minuti dopo l'intervento di castrazione; 4 = da 1h16 a 1h30 minuti dopo l'intervento di castrazione.

^{a,b} Differenti lettere indicano differenze statistiche significative ($P < 0,05$)

I valori di cortisolo sierico valutati dopo 30 minuti dalla castrazione nei gruppi C ed F differiscono da quelli ottenuti dal gruppo M. Gli unici valori che non presentano differenze statisticamente significative dal gruppo M sono quelli del gruppo T, che si presentano intermedi tra gli estremi (Fig. 2). Nessuna differenza di trattamento invece per il cortisolo rilevato dopo 4 ore dalla castrazione, al secondo prelievo di sangue.

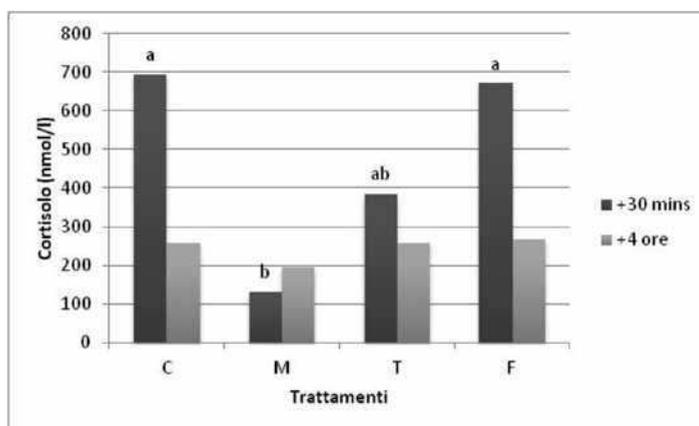


Figura 2. Valori medi di cortisolo sierico (nmol/l) per ciascun trattamento dopo 00h30 e 04h00 dalla castrazione.

Trattamenti: castrazione (C); manipolazione (M); Tolfedine (T); fisiologica (F).

^{a,b} Differenti lettere indicano differenze statistiche significative ($P < 0,05$).

DISCUSSIONE

La castrazione chirurgica del suinetto è un intervento che provoca modificazioni comportamentali e fisiologiche indicative di dolore acuto (Fredriksen et al., 2011). Anche nel presente lavoro, la castrazione senza l'utilizzo di analgesia (C) ha portato all'alterazione di alcuni parametri rispetto ai valori osservati nel gruppo dei manipolati (M). Per quanto riguarda il comportamento, il gruppo C ha infatti mostrato una minore attività locomotoria evidenziata anche in altri studi (Moya et al. 2008), con concomitante aumento della stazione in immobilità. Diversi autori attribuiscono l'alterazione di queste attività non specifiche, normalmente espresse dai suinetti, come la risposta al dolore provocato dalla castrazione chirurgica (McGlone et al., 1993; Taylor et al., 2001; Hay et al., 2003). È possibile infatti che alcune attività, quali soprattutto la deambulazione, provochino ulteriore dolore al suinetto e che per questo vengano evitate (Moya et al. 2008). Questo adattamento comportamentale è descritto da Mellor et al. (2000) come un processo protettivo che permette agli animali di ridurre la stimolazione dolorifica dei tessuti coinvolti. In accordo con i risultati di altri autori, la castrazione senza trattamenti non ha modificato altri parametri comportamentali e la localizzazione dei suinetti all'interno della gabbia parto (McGlone and Hellman, 1988; Taylor et al., 2001; Hay et al., 2003). Considerando la media delle percentuali osservate, la maggior parte dei comportamenti ha mostrato alterazioni nei primi 15 minuti dopo la castrazione, sebbene Hay et al. (2003) riportino un prolungamento di tale alterazione per i suinetti castrati oltre le 2 ore e 30 minuti per la stazione e l'isolamento, e fino a 2 giorni per altri comportamenti di risposta al dolore come il grattamento della groppa e l'agitazione della coda. Il risultato suggerisce una contenuta risposta comportamentale in termini di tempo allo stress della castrazione.

Nel presente lavoro, il gruppo C ha innalzato anche i livelli di cortisolo sierico misurati dopo 30 minuti dalla castrazione rispetto ai valori registrati nel gruppo dei suinetti manipolati, differenza non più osservabile nel prelievo dopo 4 ore. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Sutherland et al. (2012) che registrano l'aumento del cortisolo solo nelle prime 2 ore post-castrazione, ed è confermato anche dai dati di Prunier et al. (2005), Carroll et al. (2006), and Marchant-Forde et al. (2009).

I dati raccolti per il gruppo C si sono mostrati del tutto sovrapponibili a quelli del gruppo trattato con soluzione fisiologica prima della castrazione (F), sia per quanto riguarda i parametri comportamentali che quelli fisiologici, suggerendo che l'aggiuntiva manualità dell'iniezione con ago da insulina non rappresenta di per sé fonte di ulteriore stress o dolore per il suinetto castrato. I suinetti, se preventivamente trattati con acido tolfenamico (T), hanno mostrato alterazioni del comportamento e del cortisolo sierico meno marcate, con percentuali intermedie rispetto al gruppo C ed al gruppo M. Tuttavia, sia per quanto riguarda deambulazione e stazione che cortisolo, tale alterazione non è stata tale da mostrare differenze significative tra il gruppo T ed il gruppo dei manipolati (M), suggerendo una blanda percezione del dolore nei suinetti trattati. Un risultato simile è riportato anche da Wavreille et al. (2012) che ha osservato tra suinetti trattati con acido tolfenamico e suinetti solo manipolati scarse differenze nel comportamento in risposta allo stimolo dolorifico della castrazione, mostrando simile percentuale di tempo passata isolati dal gruppo e simile agitazione della coda.

Concludendo, i risultati ottenuti confermano che la castrazione provoca alterazioni comportamentali e fisiologiche che suggeriscono una condizione di dolore legata all'intervento. L'utilizzo di acido tolfenamico per l'analgesia durante la castrazione dei suinetti sembra ridurre il dolore e lo stress che l'intervento provoca, limitando le manifestazioni algiche degli animali nel post-intervento associate al tentativo di minimizzare la sofferenza. La preventiva somministrazione di acido tolfenamico sembra dunque essere auspicabile per il miglioramento del benessere dei suinetti durante e dopo la castrazione.

BIBLIOGRAFIA

- Carroll, J. A., E.L. Berg, T. A. Strauch, M. P. Roberts, and H. G. Kattesh. 2006. Hormonal profiles, behavioral responses, and short-term growth performance after castration of pigs at three, six, nine, or twelve days of age. *J. Anim. Sci* 84:1271–1278.
- De Roest, K., Montanari, C., Fowler, T., Baltussen, W., 2009. Resource efficiency and economic implications of alternatives to surgical castration without anaesthesia. *Animal* 3, 1522–1531.
- Fredriksen, B., Furnols, M.F.I., Lundstrom, K., Migdal, W., Prunier, A., Tuytens, F.A.M., Bonneau, M., 2009. Practice on castration of piglets in Europe. *Animal* 3, 1480–1487.
- Fredriksen B., Johnsen A.M.S., Skuterud E. 2011. Consumer attitudes towards castration of piglets and alternatives to surgical castration. *Research in Veterinary Science* 90:352–357.
- Hansson M., Lundeheim N., Nyman G. and Johansson G. 2011. Effect of local anaesthesia and/or analgesia on pain responses induced by piglet castration. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 53:34.
- Haya M., Vulin A., Génin S., Sales P., Prunier A. 2003. Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Applied Animal Behaviour Science* 82:201–218.
- McGlone, J. J., and J. M. Hellman. 1988. Local and general anesthetic effects on behavior and performance of two- and seven-week old castrated and uncastrated piglets. *J. Anim. Sci.* 66:3049–3058.
- Moya, S. L., L. A. Boyle, P. B. Lynch, and S. Arkins. 2008. Effect of surgical castration on the behavioral and acute phase responses of 5-day-old piglets. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 111:133–145.
- Prunier, A., A. M. Mounier, and M. Hay. 2005. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J. Anim. Sci.* 83:216–222.
- Taylor, A. A., D. M. Weary, M. Lessard, and L. Braithwaite. 2001. Behavioral responses of piglets to castration: The effect of piglet age. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 73:35–43.
- Tuytens F.A.M., Vanhonacker F., Verhille B., De Brabander D., Verbeke W. 2012. Pig producer attitude towards surgical castration of piglets without anaesthesia versus alternative strategies. *Research in Veterinary Science* 92: 524–530.
- White RG, DeShazer JA, Tressler CJ, Borchert GM, Davey S, Waninge A, Parkhurst AM, Milanuk MJ, Clemens ET. Vocalization and physiological response of pigs during castration with or without a local anesthetic. *Journal of Animal Science* 1995, 73:381-386.
- Hay M., Vulin A., Génin S., Sales P., Prunier A. 2003. Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. *Applied Animal Behaviour Science* 82, : 201-218.
- McGlone, J.J., Nicholson, R.I., Hellman, J.M., Herzog, D.N., 1993. The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration-induced behavioural changes. *J. Anim. Sci.* 71, 1441–1446.
- Mellor, D.J., Cook, C.J., Stafford, K.J., 2000. Quantifying some responses to pain as a stressor. In: Moberg, G.P., Mench, J.A. (Eds.), *The Biology of Animal Stress*. CAB International, Amsterdam, pp. 171–198.
- Sutherland M. A., Davis B. L., Brooks T. A. and Coetzee J. F. 2012. The physiological and behavioral response of pigs castrated with and without anesthesia or analgesia. *JANIM SCI* 2012, 90:2211-2221.
- Marchant-Forde, J. N., D. C. Lay, Jr., K. A. McMunn, H. W. Cheng, E. A. Pajor, and R. M. Marchant-Forde. 2009. Postnatal piglet husbandry practices and well-being: The effects of alternative techniques delivered separately. *J. Anim. Sci.* 87:1479–1492.
- Wavreille J., Danard M., Servais V., Art T., Nicks B., Laitat M. 2012. Analgésie preemptive du porcelet avant la castration: comparaison de l'effet de l'acide tolfénamique et du mélowicam sur la douleur et le stress. *Journées Recherche Porcine*, 44; 275-276.

EPIDEMIA CAUSATA DA SALMONELLA CHOLERAESUIS IN CINGHIALI DELLA PROVINCIA DI PORDENONE

OUTBREAK OF SALMONELLA CHOLERAESUIS IN WILD BOARS IN PORDENONE PROVINCE

VIO D.¹, USTULIN M.¹, BARCO L.², ZAMBON P.¹, RIGO S.¹, PEROSA G.¹, TAGLIENTE D.¹, BRUNETTA C.¹, PINZIN V.¹, RE E.³, PALEI M.⁴, CONEDERA G.¹

1 Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), SCT 4 Friuli VG, Pordenone

2 Centro di Riferenza Nazionale per le Salmonellosi, IZSVe SCS 8, Legnaro (PD).

3 Unità Sanitaria Locale ASS 6, Servizio Veterinario, Pordenone

4 Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Servizio Sicurezza Alimentare, Igiene della Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

Parole chiave: *Salmonella Choleraesuis*, cinghiale

Keywords: *Salmonella Choleraesuis*, wild boar

Riassunto: A partire dalla fine di febbraio 2012 in provincia di Pordenone è stata riscontrata una mortalità anomala nella popolazione di cinghiali selvatici. Le indagini anatomopatologiche e batteriologiche effettuate sulle carcasse rinvenute hanno identificato come causa della morte dei soggetti l'infezione setticemica da *Salmonella spp.* di gruppo C caratterizzata biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis* e antigenicamente come *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5. Analisi volte a evidenziare la presenza del patogeno sono state eseguite non solo su soggetti rinvenuti morti ma anche su organi di animali cacciati. Il presente lavoro descrive i risultati finora ottenuti dalle analisi eseguite sulle carcasse e sui campioni di organi conferiti.

Abstract: At the end of February 2012 a high mortality in wild boars population was reported in Pordenone province. Pathological and bacteriological analysis performed on wild boars identified septicaemia caused by *Salmonella* group C as cause of death. Isolated strains were biochemically identified as *Salmonella Choleraesuis* and antigenically typed as *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5. Further analysis were performed not only on carcasses but also on organs of hunted animals. In this study we describe the results obtained from the analysis carried out until 31 December 2012 on submitted samples to our Institute.

INTRODUZIONE

A partire dalla fine di febbraio 2012 sono stati riportati casi di mortalità anomala nella popolazione di cinghiali selvatici in provincia di Pordenone. Alcune delle carcasse dei soggetti rinvenuti morti sono state conferite alla Sezione di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie per l'esame necroscopico e le analisi del caso. A seguito dell'isolamento di *Salmonella spp.* di gruppo C caratterizzata biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis* e antigenicamente come *Salmonella enterica* C1 6,7:-:1,5 e considerato il pericolo per la Sanità Pubblica potenzialmente rappresentato da questo tipo di patogeno, l'Autorità Sanitaria Regionale, supportata dal Servizio Sanitario Locale, dal Servizio Caccia e Pesca della Provincia e dall'IZSVe, ha informato i cacciatori riguardo

i rischi connessi alla manipolazione delle spoglie dei cinghiali e al consumo di carni di cinghiale non cotte, chiedendo di conferire le carcasse rinvenute alla Sezione IZSve di Pordenone. È stato inoltre richiesto il conferimento presso l'Istituto di polmoni, fegato e milza degli animali cacciati per l'esecuzione dell'esame anatomo-patologico e batteriologico per la ricerca di *Salmonella spp.*, al fine di monitorare la diffusione del patogeno nella popolazione selvatica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Dal 15/03/2012 al 31/12/2012 sono state sottoposte ad analisi 24 carcasse di cinghiali rinvenuti morti e gli organi di 259 soggetti cacciati, per un totale di 673 campioni di organi (254 fegati, 249 polmoni, 170 milze).

Inizialmente sono state incluse nel monitoraggio tutte le Riserve di caccia dei Distretti Venatori della Pedemontana Pordenonese e dell'Alta Pianura Pordenonese. Le analisi eseguite sugli organi dei primi 190 soggetti abbattuti in azione venatoria hanno evidenziato che la distribuzione delle positività per *Salmonella Choleraesuis* era limitata a sole cinque Riserve confinanti della zona Pedemontana ed è stato pertanto deciso di limitare il monitoraggio all'area interessata dall'infezione e alle Riserve di caccia limitrofe.

Esame autoptico

Tutte le carcasse e gli organi conferiti sono stati sottoposti ad esame autoptico; gli organi dei soggetti in buono stato di conservazione, in caso di evidenza di alterazioni anatomo-patologiche, sono stati sottoposti ad esame istologico.

Esami batteriologici e ricerca Salmonella

Tutti i campioni di organo (fegato, milza e polmone) provenienti sia da carcasse di animali morti che appartenenti ad animali regolarmente abbattuti sono stati sottoposti singolarmente ad esame batteriologico; i terreni utilizzati sono stati Agar Sangue (AS) ed Eosin Methilene Blue Agar (EMB) incubati a 37 °C per 24-48 ore.

Pool di organi costituiti da polmone, milza e fegato di tutti i soggetti conferiti (sia morti che cacciati) sono stati sottoposti alla ricerca specifica di *Salmonella spp.* in base ad una procedura interna, adattamento della metodica descritta nella ISO 6579:2002/Amd1:2007 e integrata secondo quanto previsto dal manuale OIE nei capitoli 2.9.9 (Salmonelle mobili) e 2.3.11 (*Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*). Tale procedura è applicabile sia alla ricerca di Salmonelle mobili che immobili e specie specifiche nei campioni di origine animale diversi da feci e campioni ambientali. Per il prearricchimento è stato prelevato un pool di 25g degli organi sopradescritti e omogeneizzato in 225 ml di Acqua peptonata tamponata sterile (APTS). Nel caso di carcasse di animali morti, la ricerca di Salmonella è stata eseguita anche da intestino prelevando 1 g di contenuto intestinale e omogeneizzandolo in 9 ml di APTS. Ogni campione in APTS è stato incubato a 37°C ± 1°C per 18 h ± 2 h. Al termine dell'incubazione si è proceduto all'arricchimento inoculando 0,1 ml del prearricchito in 9 ml di Brodo Rappaport Vassiliadis addizionato con soia (RVSB). Il brodo è stato incubato a 37°C ± 1°C per 24 h ± 3 h. Al termine dell'incubazione un'ansata di brodo di arricchimento è stata seminata su piastre di Brillant Green Agar (BGA), Xylose Lysine

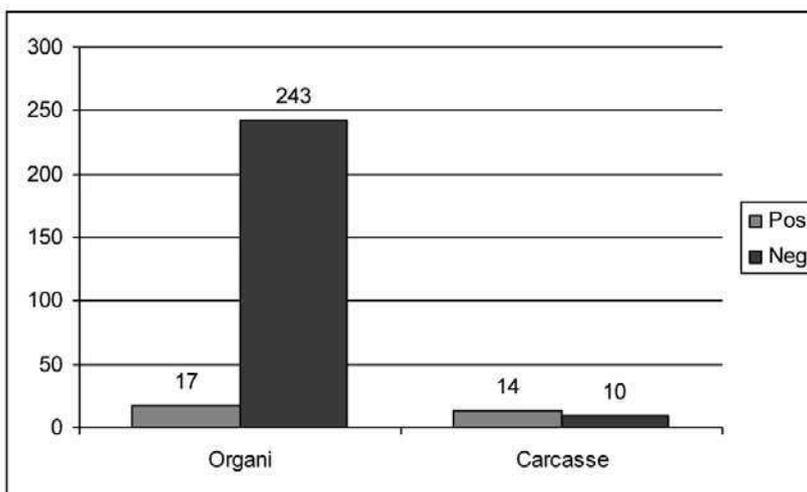
Deoxycholate Agar (XLD) e McConkey Agar (McC), incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, con lettura della piastra a 24, 48 e 72 h. Su BGA le colonie di Salmonella presentano colorito rosso/rosa con viraggio del terreno al rosa, su XLD le colonie di Salmonella produttrici di H_2S presentano precipitato nero e alone rosa, mentre i ceppi non produttori di H_2S determinano la formazione di colonie rosate. Generalmente le Salmonelle immobili e specie specifiche, come *Salmonella Choleraesuis*, non producono H_2S o ne sono solo deboli produttrici, come nel caso dei ceppi isolati in questo studio. Il terreno McC permette di evidenziare la fermentazione del lattosio, le colonie di Salmonella e delle altre Enterobatteriacee lattosio negative sono incolori.

Le colonie con morfologia riconducibile a *Salmonella spp.* sono state seminate su Kligler Iron Agar (KIA) e incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per $24 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$. La crescita di colture tipiche di Salmonella su KIA determina il viraggio al giallo della parte inferiore del terreno, ma la precipitazione di H_2S ne determina l'annerimento, mentre la porzione a becco di clarino rimane rossa con precipitato nero in corrispondenza della patina batterica (aspetto a coda di topo). I ceppi isolati nel corso del presente studio, deboli produttori di H_2S , hanno determinato l'annerimento parziale della parte inferiore del terreno.

Dai ceppi che presentavano su KIA caratteristiche tipiche di *Salmonella spp.* si è proceduto alla conferma biochimica utilizzando il kit d'identificazione API20E (Biomerieux) e, una volta ottenuta tale conferma, a seminare il ceppo su di Agar Triptosio (AT) per la sierotipizzazione secondo lo schema Kauffman-White eseguita dal Centro di Referenza Nazionale per le Salmonellosi; i ceppi tipizzati sono stati conservati.

RISULTATI

Al 31/12/2012 *Salmonella Choleraesuis*. è stata isolata da 14 delle 24 carcasse conferite di cinghiali rinvenuti morti (58,3%) e da 17 dei 259 animali cacciati (6,5%) per un totale di 31 animali (Graf. 1). Le positività si sono localizzate in 5 comuni attigui della provincia di Pordenone (Fig. 1): Aviano, Budoia, Caneva, Montereale Valcellina e Polcenigo.



Graf. 1: Distribuzione delle positività su carcasse e organi di animali abbattuti

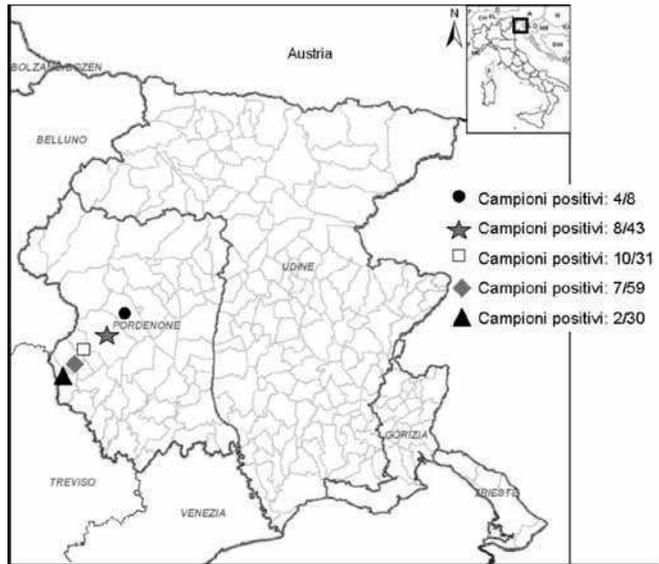


Fig. 1: Distribuzione geografica dei campioni positivi per *Salmonella spp.*

L'esame necroscopico delle carcasse (n. 24) ha evidenziato prevalentemente le seguenti lesioni: congestione ed edema interstiziale a carico dei polmoni (figura 2), pleurite acuta (in un caso le lesioni presentavano le caratteristiche di una polmonite necrotico-emorragica associata a pleurite); epato-splenomegalia, linfoadenopatia; in due soggetti sono inoltre state evidenziate petecchie emorragiche a carico della corticale renale, due soggetti presentavano gastrite emorragica. In un soggetto, oltre alle lesioni sopradescritte è stata rilevata endometrite purulenta (figura 3), linfoadenomegalia del distretto inguinale e grave degenerazione epatica; in questo caso le indagini istologiche hanno evidenziato endometrite purulento-necrotico-ulcerativa, lesioni pio-granulomato-se-necrotiche a carico dei linfonodi inguinali, istiocitosi splenica, epatite pio-granulomatosa necrotica multifocale e steatosi multifocale e degenerazione idropica degli epatociti.



Fig 2: Polmonite necrotico-emorragica in un soggetto rinvenuto morto.



Fig. 3: Endometrite purulenta in un soggetto rinvenuto morto.

Gli esami istologici eseguiti nei soggetti in buono stato di conservazione hanno evidenziato quadri omogenei caratterizzati da polmonite necrotico-emorragica del parenchima polmonare, necrosi epatica, emorragie spleniche associate ad aggregati batterici. In un solo caso è stata rilevata enterite necrotica associata ad aggregati batterici e infiltrazione di granulociti eosinofili e di linfoplasmacellule nella lamina propria. A carico degli organi degli animali cacciati non sono state rilevate lesioni anatomopatologiche riferibili all'infezione da *Salmonella*.

Nelle 14 carcasse positive all'esame batteriologico, *Salmonella Choleraesuis* è stata isolata in purezza e in carica elevata dagli organi e solo in due casi dall'intestino. Per quanto riguarda l'isolamento di altri patogeni batterici soltanto nel polmone di un cinghiale cacciato è stata riscontrata la presenza di *Pasteurella multocida* mentre dall'utero di una femmina a carico della quale è stata rilevata una grave endometrite purulenta è stato rilevato *Escherichia coli* in carica elevata.

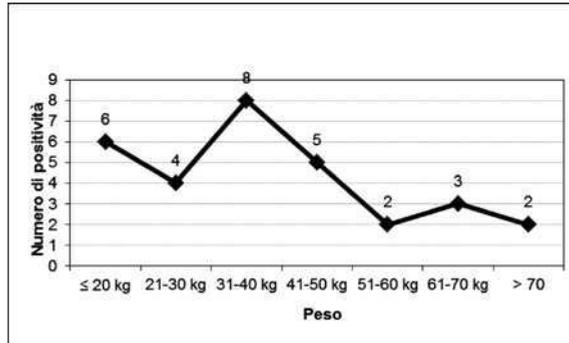
In 8 dei soggetti cacciati è stato possibile evidenziare *Salmonella Choleraesuis* solamente mediante la ricerca specifica del patogeno, mentre in 7 dei soggetti cacciati *Salmonella Choleraesuis* è stata invece isolata solamente all'esame batteriologico di uno o più organi.

Tutti i ceppi isolati sono stati caratterizzati biochimicamente come *Salmonella Choleraesuis*, di questi 24 sono stati identificati sierologicamente come Gr. C1 6,7:-:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*, 2 come Gr. C1 6,7:c:1,5 *S. Choleraesuis* var Kunzendorf, 4 come :-:-:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*, 1 come :-:c:1,5 *S. enterica* subsp *enterica*.

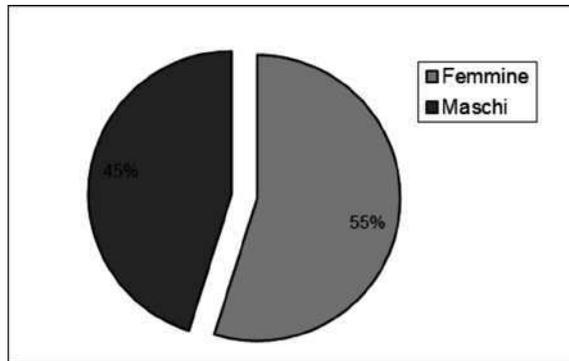
Quattro ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Referenza Europeo per la *Salmonella* (RIVM, Bilthoven-NL), il quale confermando le tipizzazioni effettuate ha ulteriormente classificato 3 ceppi come biovar Decatur e uno come biovar Kunzendorf.

Un ceppo di *Salmonella spp.* proveniente dagli organi di un cinghiale cacciato, è stato caratterizzato antigenicamente come *Salmonella Typhimurium*.

Gli animali positivi erano soggetti giovani, di peso vivo compreso tra 10 e 85 chilogrammi (Graf. 2).

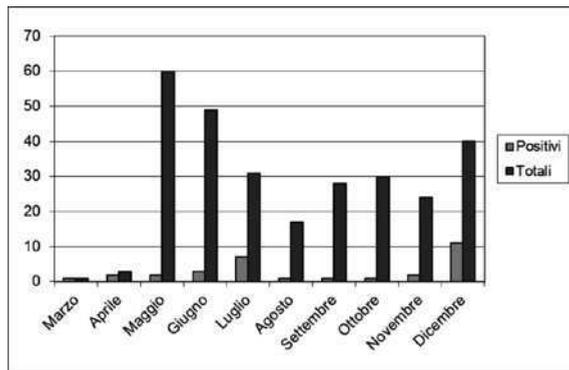


Graf. 2: Distribuzione dei pesi nei soggetti positivi
Per quanto concerne il sesso degli animali conferiti, 17 erano femmine e 14 maschi (Graf. 3).



Graf. 3: Distribuzione delle positività in base al sesso

Come si evince dal Graf. 4, il maggior numero di soggetti rinvenuti positivi sono stati conferiti nei mesi di luglio e dicembre.



Graf. 4: Distribuzione temporale delle positività

DISCUSSIONE

Salmonella Choleraesuis è causa nel suino di forme setticemiche caratterizzate da bassa morbilità, generalmente inferiore al 10%, ed elevata letalità. Le forme cliniche sono caratterizzate da febbre elevata, sintomi respiratori, letargia, cianosi delle estremità e dell'addome, talvolta ittero. Le lesioni anatomopatologiche comprendono splenomegalia, epatomegalia, linfadenopatia, polmonite interstiziale, necrosi epatica focale che comunque non sono evidenziabili regolarmente in tutti i soggetti colpiti (Zimmerman et al., 2006).

L'infezione causata da *Salmonella* Choleraesuis, specie specifica del suino, ha una prevalenza elevata in Paesi asiatici e nel Nord America mentre è rara in Australia ed Europa (Fedorka-Cray et al., 2000).

Le varianti sierologiche di *Salmonella* Choleraesuis isolate nel corso del presente studio sembrano essere particolarmente rare e non ci risulta che siano mai state isolate prima nel Nord Est Italia. In particolare *Salmonella* Choleraesuis non è mai stata isolata durante i programmi di sorveglianza sanitaria della fauna selvatica che si svolgono regolarmente da diversi anni nella regione Friuli Venezia Giulia.

In nessuno degli allevamenti di suini della regione è stata identificata la presenza di *Salmonella* Choleraesuis né in corso di focolai di salmonellosi né durante in un recente studio di prevalenza effettuato presso il nostro Istituto.

Pur trattandosi di una variante di *Salmonella* specie specifica dei suidi, *Salmonella* Choleraesuis può, in rari casi, causare gravi infezioni setticemiche anche nell'uomo; pertanto sono stati previsti interventi per prevenire la possibilità che categorie a rischio (cacciatori, guardie forestali) possano contrarre tale infezione venendo a contatto con animali portatori sani o carcasse di animali deceduti.

Mentre l'elevato livello di biosicurezza degli allevamenti intensivi rende molto improbabile il contatto con selvatici e dunque la trasmissione del patogeno, il rischio può invece essere concreto nei suini allevati all'aperto.

L'aumento dei prelievi venatori, delle denunce di danni alle coltivazioni e degli investimenti hanno dimostrato come negli ultimi anni la popolazione di cinghiali nella regione Friuli Venezia Giulia sia notevolmente aumentata e come questi animali dimostrino scarso timore ad avvicinarsi ad aree abitate. Le abitudini gregarie di questa specie possono spingere gli animali ad avvicinarsi a zone occupate da suini domestici allevati all'aperto. Le recinzioni elettrificate generalmente utilizzate per contenere animali allevati allo stato brado o semibrado si sono dimostrate efficaci anche per impedire l'accesso dei cinghiali alle zone occupate dai suini domestici, tuttavia piccoli allevamenti familiari che non dispongono di questa protezione possono rappresentare un punto di contatto tra domestico e selvatico.

Tenuto conto che la maggior parte dei campioni positivi appartenevano ad animali giovani, di peso inferiore ai 50 chilogrammi, è probabile che questa categoria di età sia quella più frequentemente colpita dall'infezione.

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio evidenziano la possibilità che il cinghiale possa diventare fonte di *Salmonella* Choleraesuis per l'uomo. La Regione Friuli Venezia Giulia, supportata dai Servizi Veterinari, dal Servizio Caccia e Pesca della Provincia di Pordenone e dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie in seguito ai primi casi confermati, ha fornito informazioni rivolte ai cacciatori richiedendo di riferire casi di mortalità anomala nella popolazione di cinghiale, la presenza di animali morti sul territorio e di conferire fegato, milza e polmoni degli animali abbattuti. I cacciatori sono stati inoltre informati in merito ai rischi connessi alla manipolazione ed eviscerazione delle carcasse ed è stato fortemente sconsigliato il consumo

di prodotti a base di carni crudi quali insaccati.

L'infezione causata da *Salmonella* Choleraesuis nel suino, ha una prevalenza elevata in Paesi asiatici e nel Nord America mentre è rara in Australia ed Europa (Fedorka-Cray et al., 2000). Le varianti sierologiche di *Salmonella* Choleraesuis isolate nel corso del presente studio sembrano essere particolarmente rare e non ci risulta che siano mai state isolate prima nel Nord Est Italia (Enter-Vet Report 2010); in particolare *Salmonella* Choleraesuis non è mai stata isolata durante i programmi di sorveglianza sanitaria della fauna selvatica che si svolgono regolarmente da diversi anni nella regione Friuli Venezia Giulia. Le tecniche biomolecolari applicate ai ceppi isolati potrebbero essere di ausilio per chiarire l'epidemiologia di questo evento.

In nessuno degli allevamenti di suini della regione è stata identificata la presenza di *Salmonella* Choleraesuis, né in corso di questo episodio di salmonellosi nel cinghiale né durante un recente studio di prevalenza effettuato presso il nostro Istituto, molto probabilmente in ragione delle misure di biosicurezza adottate anche al fine di evitare il contatto degli animali allevati con altri selvatici.

Ringraziamenti: gli autori ringraziano per la fattiva collaborazione l'Assessorato e il Servizio Caccia e Pesca della Provincia di Pordenone e tutti i cacciatori che hanno contribuito.

BIBLIOGRAFIA

- Cowled B. D., Ward M. P., Laffan S. W., Galea F., Garner M. G., MacDonald A. J., Marsh I., Muellner P., Negus K., Quasim S., Woolnough A. P., Sarre S. D. "Integrating Survey and Molecular Approaches to Better Understand Wildlife Disease Ecology" PLoS ONE; Oct 2012, Vol. 7 Issue 10, Special section p1.
- Enter-Vet Report 2010 http://www.izsvenezie.it/images/stories/Pdf/salmonellosi/report_Enter_Vet_2010.pdf
- Fedorka-Cray PJ, Gray JT, Wray C "Salmonella infections in pigs". In: Wray C, Wray A (eds) Salmonella in domestic animals. CAB International, Wallingford, pp 1191–1207, 2000
- Paulsen P., Smulders F.J.M., Hilbert F. "Salmonella in meat from hunted game: A Central European perspective"
- Wacheck S., Fredriksson-Ahomaa M., Koenig M., Stolle A., Stephan R. "Wild Boars as an Important Reservoir for Foodborne Pathogens". Foodborne Pathog Dis, Vol. 7 Issue 3, 2010.
- Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M., Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus), Diseases of swine 9th edition, Blackwell Publishing (2006), 387-417.

INDAGINE SULLA CIRCOLAZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A NELLA POPOLAZIONE DI CINGHIALI DELLE PROVINCIE DI PARMA E PIACENZA

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF SWINE INFLUENZA A VIRUS IN WILD BOAR POPULATION IN PARMA AND PIACENZA ITALIAN PROVINCES

FONI E.¹, GARBARINO C.², CHIAPPONI C.¹, CORDIOLI P.³, BAIONI L.¹, ZANNI I.¹

¹ OIE Reference Laboratory for Swine Influenza Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Via Dei Mercati 13A, 43126 Parma;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna,
Strada Faggiola 1, 29027 Piacenza

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Virologia Via A. Bianchi
9 25125 Brescia.

Parole Chiave: influenza virus, cinghiale, anticorpi

Key words: influenza virus, wild boar, antibodies

RIASSUNTO

Lo studio riporta i dati di un monitoraggio virologico e sierologico nei confronti del virus influenzale tipo A nella popolazione di cinghiali presenti sul territorio delle provincie di Parma e Piacenza. Nell'ambito dei programmi di contenimento sul territorio del numero di cinghiali e della attuazione del Piano Regionale di Monitoraggio della Fauna Selvatica sono stati raccolti 354 campioni di polmone da cinghiali, abbattuti e cacciati, pervenuti nei centri di raccolta autorizzati per la lavorazione delle carcasse. Sono stati inoltre raccolti 1977 campioni di siero. I 354 campioni di polmone sono stati esaminati per la presenza gene M del virus dell'influenza tramite Real Time PCR. I 12 campioni risultati positivi sono stati sottoposti a prove di isolamento virale e RT multiplex PCR per identificazione del sottotipo. I test di isolamento virale hanno permesso di ottenere 3 isolati virali che, tramite prove di tipizzazione biomolecolare e antigenica sono risultati stipiti virali riferibili al sottotipo avian-like H1N1 suino. L'analisi filogenetica di uno degli stipiti isolati dal cinghiale, A/wb/291320/12, ha confermato i dati antigenici. L'indagine condotta non ha messo in evidenza nei polmoni considerati la presenza di virus influenzale H1N1 pdm 2009. Dei 1977 sieri esaminati, 78 campioni sono risultati positivi per anticorpi nei confronti della nucleoproteina del virus influenza A e 68 di questi presentavano titoli nei confronti dell'isolato A/wb/291320/12.

ABSTRACT

Since July 2012 to December 2012, during hunting and culling programs, 354 lungs samples were collected from wild boar stalked in Parma (n= 224) e Piacenza (n=130). The samples were submitted to Real Time PCR for gene M of SIV. The samples resulted positive to PCR tests were submitted to isolation tests. The real time PCR tests detected 12 SIV positive samples (3,38%), 3 SIV were isolated ant they were identified the isolates as avian-like SIV subtype H1N1. Phylogenetic analysis of the sequences obtained from isolate A/wb/291320/12 showed it clustered with recent Italian avian-like H1N1 SIVs isolated from domestic pigs. A collection of 1977 sera samples were submitted to ELISA test against Nucleoprotein of Influenza A virus and the 78 positive samples were submitted to inhibition

of haemoagglutination test. 68 samples showed positive titers to the isolate A/wb/291320/12. This study suggests that SIV actively circulates in wild boar population in the investigated area. Wild boar influenza A virus infection should be more widely studied to better understand the epidemiological role of this specie in the evolution of influenza virus infection.

INTRODUZIONE

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia *Orthomixoviridae*, genere *Influenzavirus* che comprende tre tipi: A, B e C. I virus di maggiore importanza sono i virus appartenenti al tipo A che infettano sia l'uomo che varie specie animali: principalmente suini, canidi, equini, uccelli selvatici e domestici. Le specie aviarie selvatiche svolgono un ruolo primario nell'ecologia del Virus Influenza tipo A (Alexander et al 2000). Per le caratteristiche di segmentazione del genoma virale i virus influenza A, e quindi anche il virus dell'influenza suina, vanno incontro nel tempo a continue evoluzioni antigeniche (Webster 1998). Il suino, in particolare, svolge un ruolo importante nell'ecologia del virus influenzale in quanto specie suscettibile ad infezione sia da parte di virus aviari che virus che infettano i mammiferi, compreso l'uomo (Brown 2000).

L'evoluzione subita nel corso del tempo dal virus dell'influenza suina ha portato attualmente alla circolazione nella popolazione suina italiana di tre diversi principali sottotipi H1N1, H3N2, H1N2 e recentemente del sottotipo H1N1pdm 2009, il coinvolgimento del virus influenzale suino nel determinismo dell'insorgenza delle forme respiratorie nell'allevamento intensivo è stimato intorno al 12% dei casi (Foni E. et al. 2010).

Se molto è stato fatto nello studio epidemiologico del virus influenzale per le specie animali domestiche, senz'altro uno studio più approfondito delle dinamiche di evoluzione della infezione influenzale nelle specie selvatiche sarebbe auspicabile. Esigue e parcellizzate sul territorio sono le indagini epidemiologiche riguardanti il ruolo svolto dal suino selvatico e/o dal cinghiale, entrambi appartenenti alla specie *Sus scrofa*, nel mantenimento e/o diffusione del virus influenzale. Studi di prevalenza sierologica nei confronti del virus influenzale in questa specie vengono riportati in alcuni paesi Europei nei confronti del sottotipo H1N1: 0,7% in Polonia (Markowska 2003), 4% (Vincente 2002) e 6,4% (Closa-Sebastià et al. 2011) in Spagna. Uno studio svolto in Slovenia non ha evidenziato positività per influenza su 178 campioni di siero (Vengust 2006), in Germania si è osservata positività del 7,8% e 5,2% in studi di due anni consecutivi (Kaden et al. 2008, Kaden et al. 2009), in Croazia si è riscontrata positività del 9,7% (Roic et al 2012). Anche negli USA, se pur su esigui numeri di osservazioni, alcuni studi hanno evidenziato positività sierologica nei suini selvatici nei confronti di influenza suina in Oklahoma (Saliki et al. 1998) e in Kansas (Gipson et al. 1999). Alcuni autori nel South and North Carolina, hanno riscontrato variazioni dallo 0% al 91% a seconda dell'area geografica (Corn et al. 2009). In Texas, recentemente, è stata dimostrata, nei suini selvatici, la circolazione di un virus influenzale riferibile al sottotipo H1N1 pdm 2009 (Clavijo et al. 2012). Nel sud della Francia, in un'area condivisa da popolazione di cinghiali e specie aviari acquatiche in migrazione è stata condotta una indagine sia virologica che sierologica nei cinghiali senza poter dimostrare la circolazione di virus influenzali (Vittecoq et al. 2012).

In Italia, dati non recenti hanno escluso la circolazione del virus influenzale nella popolazione di cinghiali nell'area dell'Appennino Parmense (Cordioli et al. 1993), osservazione confermata da studi più recenti che riguardano i cinghiali presenti nell'Arco Alpino occidentale (Ferroglio et al. 2003).

In questo studio, considerata l'alta densità di allevamenti suini presenti nell'area padana, l'elevata incidenza di infezione da influenza virus nell'allevamento intensivo del suino

commerciale (Foni et al. 2010) e il progressivo aumento della numerosità della popolazione di cinghiali sul territorio italiano (Carnevali et al. 2009), si è operato al fine di acquisire dati epidemiologici recenti riguardo alla circolazione di virus influenzale nella popolazione di cinghiali. E' stata individuata come area di interesse quella delle provincie di Parma e Piacenza che comprendono vaste aree di territorio di superficie protetta che ricade sotto la gestione Parchi Regionali "Area Parchi Emilia Occidentale".

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Luglio 2012 e Dicembre 2012 nell'ambito della attività di sorveglianza attiva prevista dal Piano Regionale di Monitoraggio della Fauna Selvatica 2012-2013, si è concordata la raccolta di campioni di polmoni provenienti da soggetti abbattuti sia nel corso della attività venatoria che nell'ambito dei piani provinciali di controllo delle provincie contigue di Parma e Piacenza. Dei 354 campioni prelevati 130 campioni provenivano dall'area piacentina e 224 campioni dall'area parmense. Si è proceduto inoltre anche alla raccolta e stoccaggio dei sieri di cinghiali cacciati o abbattuti nella medesima area nello stesso arco temporale. Complessivamente sono stati raccolti 1977 campioni di siero.

I 354 campioni di polmone sono stati esaminati con tecnica di Real-Time PCR (Slomka et al.2010) per la ricerca di virus influenzale tipo A. I campioni positivi per la presenza del gene M di virus influenzale di tipo A sono stati quindi inoculati su uova embrionate di pollo SPF e su due linee cellulari, CACO-2 e MDCK, come descritto in precedenza (Chiapponi et. al 2009).

Per verificare la presenza del virus influenzale i sovrinatanti delle colture e i liquidi allantoidei raccolti sono stati sottoposti a test ELISA nei confronti della nucleoproteina di virus influenzali di tipo A (Foni E. et al. 1995) e a test di emoagglutinazione (OIE 2010). Prima di definire un campione come negativo i test sono stati eseguiti su due passaggi seriali di isolamento.

Sui campioni risultati positivi per presenza di virus influenzale si è proceduto alla tipizzazione del virus isolato mediante RT Multiplex PCR (Chiapponi et al. 2012), confermata da test di inibizione dell'emoagglutinazione allestito utilizzando sieri iperimmuni nei confronti di virus di referenza del virus influenzale suino (OIE 2010). Nei casi in cui i campioni di polmone, pur risultando positivi in PCR, risultavano negativi all'isolamento virale, si è proceduto ad eseguire RT multiplex PCR a partire dall'omogenato di polmone, al fine di individuare il sottotipo di virus influenzale suino presente se pur non isolabile.

Uno degli stipiti isolati è stato sottoposto ad analisi genetica tramite sequenziamento dell'antigene HA, NA e degli altri geni interni mediante sequenziatore automatico ABI 3130. Le sequenze ottenute sono state elaborate con il software Lasergene (DNASTAR, Madison, WI). Le sequenze genetiche ottenute sono state allineate mediante il software ClustalW (Larkin et Al. 2007) con sequenze di virus influenzali suini di riferimento presenti in GenBank e sequenze di isolati presso l'IZSLER. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il software MEGA5 con il metodo Neighbor-Joining con test bootstrap (1000 replicati) (Tamura et al. 2011).

I 1977 campioni di siero di cinghiale raccolti sono stati esaminati tramite test ELISA per la presenza di anticorpi nei confronti di NP del virus influenza A (De Boer et al. 1990). I campioni risultati positivi sono stati testati mediante inibizione dell'emoagglutinazione (Kendall et al. 1992, OIE 2010) per la presenza di anticorpi verso i tre sottotipi circolanti attualmente nella popolazione suina e precisamente: H1N1 A/sw/It/267505/10, H3N2 A/sw/It/312583/09 e H1N2 A/sw/It/284922/09. Nella prova è stato inoltre utilizzato, in parallelo, lo stipite virale omologo isolato da cinghiale: A/wild boar/It/ 291320/12. Sono stati considerati

positivi i campioni che presentavano titolo $\geq 1/20$. Nel caso di positività nei confronti di più sottotipi, al fine di evitare errori di interpretazione dovuti a cross reattività del siero, un campione veniva considerato negativo nei confronti di un determinato sottotipo se la differenza nei confronti dell'altro sottotipo era maggiore di due diluizioni in base 2.

RISULTATI

Dei 354 campioni di polmoni sottoposti ad analisi biomolecolare, 12 campioni (3,38%) sono risultati positivi per la presenza del gene M del virus dell'influenza A. I test di isolamento virale su questi campioni positivi hanno permesso di ottenere 3 isolati virali che, sia tramite prove di tipizzazione biomolecolare in multiplex PCR, sia tramite prove di tipizzazione antigenica tramite tecnica sierologica sono risultati stipiti virali riferibili al sottotipo avian-like H1N1 suino. I 12 campioni PCR positivi facevano parte dei 130 campioni raccolti nella provincia di Piacenza, in particolare si trattava di soggetti abbattuti nei comuni di Bobbio, Vernasca, Rivergaro e Ponte dell'Olio. Per quanto riguarda i rimanenti 9 campioni positivi a PCR, ma negativi all'isolamento virale, la prova di tipizzazione biomolecolare applicata all'omogenato di polmone ha messo in evidenza virus influenzale suino H1N1 avian-like. L'indagine condotta non ha messo in evidenza nei polmoni considerati la presenza di virus influenzale H1N1 pdm 2009.

L'analisi filogenetica dello stipite isolato dal cinghiale dimostra la sua stretta correlazione con i virus influenzali suini sottotipo H1N1 avian-like isolati negli ultimi anni, sia per quanto riguarda l'antigene HA che per quanto riguarda l'antigene NA (Fig. 1 e 2).

La prova immunoenzimatica ELISA per la ricerca di anticorpi nei confronti della nucleoproteina del virus influenzale eseguita su 1977 campioni di siero di cinghiale collezionati nel corso del 2012 dai cinghiali abbattuti, ha messo in evidenza la presenza di 78 sieri positivi (3,9%). Di questi 42 provenivano da soggetti abbattuti sul territorio della provincia di Parma e 36 da soggetti abbattuti in provincia di Piacenza.

La reazione di inibizione dell'emoagglutinazione eseguita sui 78 campioni risultati positivi al test immunoenzimatico, ha messo in evidenza la presenza di 58 campioni di siero con anticorpi nei confronti del sottotipo H1N1 A/sw/It/267505/10 utilizzato nella routine diagnostica dell'influenza suina e di 68 campioni positivi nei confronti del virus omologo A/wb/It/291320/12, il primo stipite isolato nel corso dell'indagine. Dei 68 campioni positivi 35 provenivano dal parmense e 33 dal piacentino. Solo 1 campione ha presentato titoli nei confronti del sottotipo H3N2 con un valore (1/640) non ascrivibile a cross reattività, si tratta di un campione proveniente dal comune di Bobbio. Le prove eseguite con lo stipite omologo isolato da cinghiale, hanno evidenziato non solo un numero più elevato di sieri positivi complessivamente sulle due province, ma hanno dato la possibilità di evidenziare titoli più elevati come evidenziato nella tabella n. 1.

H1N1	n. positivi	20	40	80	160	320	640	>1280
A/sw/It/267505/10	58	21	21	12	1	3	0	0
A/wb/It/291320/12	68	8	16	15	17	8	2	2

Tabella n.1: Confronto fra titoli anticorpali ottenuti in reazione di inibizione dell'emoagglutinazione utilizzando virus H1N1 suino e virus H1N1 cinghiale.

DISCUSSIONE

L'indagine condotta sui campioni di polmone raccolti nel corso delle attività venatoria e di abbattimento programmato sul territorio delle provincie di Parma e Piacenza, ha messo in evidenza, per la prima volta, la circolazione di virus influenzale sottotipo H1N1 nei cinghiali, in un'area in cui si osserva una elevata densità di questa popolazione. La positività virologica è stato documentato essere peculiarità dei soggetti abbattuti in alcuni comuni della provincia di Piacenza. Pertanto restringendo l'ambito territoriale solo a questa provincia, la percentuale di positività dal 3,38% sul totale, sale a 9,23%. Le indagini sierologiche condotte sui 1977 sieri di cinghiale, oltre che confermare la circolazione del sottotipo H1N1 nei cinghiali dell'area piacentina, ha evidenziato che lo stesso virus sembra circolare anche nell'area parmense, visto il riscontro di positività, tramite inibizione dell'emoagglutinazione, di 35 campioni su 42 campioni positivi in test ELISA. Questo riscontro non sorprende vista la contiguità del territorio delle due provincie, le caratteristiche orografiche del confine e la tendenza del cinghiale a muoversi sul territorio. I titoli anticorpali elevati riscontrati utilizzando lo stipite cinghiale consentono di confermare la circolazione recente del virus. Il dato percentuale di positività virologica riscontrato in questo studio è un dato finora unico nel panorama epidemiologico europeo dell'influenza nei cinghiali. Viene riportato l'isolamento di 2 virus appartenenti al sottotipo H3N2 in Germania su 242 campioni esaminati (Kaden et al. 2008). Non va sottovalutato, se pur nella scarsa significatività numerica, il riscontro di positività sierologica nei confronti del sottotipo H3N2 in un cinghiale del comune di Bobbio, che suggerisce la necessità di ulteriori indagini per verificare se anche il sottotipo H3N2 possa svolgere un ruolo nell'epidemiologia dell'influenza in questa specie selvatica.

I dati dell'analisi filogenetica evidenziano che lo stipite circolante nella popolazioni di cinghiali è strettamente correlato al virus influenzale suino. Si è tentato di valutare quali dati oggettivi ambientali potevano essere stati determinanti nell'andamento epidemiologico dell'infezione fotografato dall'indagine.

L'analisi di elementi disponibili nella banca dati del centro Sorveglianza Epidemiologica Emilia Romagna (SEER) hanno evidenziato come nell'area dei comuni nei quali sono stati cacciati i soggetti risultati positivi al test virologico, siano presenti allevamenti familiari di suini, alcuni dei quali, di tipo semibrado anche aperto (Fig. n. 3). Possiamo ipotizzare che questi allevamenti possano rappresentare fonte di contaminazione per la popolazione selvatica per vari agenti patogeni e quindi anche per il virus dell'influenza che, nella popolazione suina domestica di tipo intensivo, per quanto riguarda il sottotipo H1N1, può raggiungere il 47% di incidenza nei casi clinici di forme respiratorie causati da virus influenzale (Foni E. com. pers). A questo osservazione si aggiunge anche la rilevazione, non georeferenziata, della presenza nella provincia di Piacenza, di allevamenti di cinghiali di tipo semibrado in recinto, nei quali non si può escludere possano essere stati introdotti suini domestici.

CONCLUSIONI

L'approfondimento delle conoscenze sulla epidemiologia del virus influenzale A nell'ambito umano, aviario e suino e negli eventi di interscambio virale fra le specie è sempre stato considerato un passo obbligato per poter interpretare le dinamiche che sottendono alla sua evoluzione genetica. Considerata l'importanza dell'ambiente selvatico come reservoir del virus influenzale, la dimostrazione della circolazione di virus H1N1 nel cinghiale, conferisce a questa specie un ruolo epidemiologico da valutare attentamente. Va considerata la capacità degli adulti questa specie di coprire lunghe distanze durante l'attività venatoria o per la ricerca di cibo e/o di accoppiamento, comportamento che amplia considerevolmente la possibilità di trasmissibilità dell'infezione nell'ambito selvatico e da questo a quello domestico. Ne

conseguono un aumento di probabilità di interscambio virale tra specie domestiche e selvatiche sia della stessa specie, suina in questo caso, ma anche tra specie diverse, con maggior probabilità quelle aviari. La pianificazione, per legge, di piani di limitazione per il cinghiale e i piani di controllo previsti da Piani Regionali di Monitoraggio della Fauna Selvatica, almeno per le regioni Lombardia ed Emilia Romagna, rappresentano solidi presupposti perché una sorveglianza accurata sul territorio si possa realizzare.

Ringraziamenti: Si ringrazia il Servizio Vigilanza dell'Ente di Gestione per i Parchi e la Biodiversità Emilia Occidentale e i Veterinari dell'AUSL di Piacenza per la collaborazione fornita nella raccolta dei campioni, la Sig.ra Bresciani Daniela e la Sig.ra Roberta Manfredi per la preziosa collaborazione tecnica, il Dr. Giorgio Galletti per aver fornito i dati del SEER.

BIBLIOGRAFIA

Alexander, D.J., 2000. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74, 3–13.

Brown, I.H., 2000. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet. Microbiol.* 7, 29–46.

Carnevali L., Pedrotti L., Riga F., Toso S. (2009) Banca Dati Ungulati: Status, distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di Ungulati in Italia. Rapporto 2001-2005. *Biol. Cons. Fauna*, 117:1-168

Chiapponi C. Zanni I., Garbarino C., Barigazzi G., and Foni E. (2010) “Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses” *Journal of Virological Methods*, Jan;163(1):162-5.

Chiapponi C., Moreno A., Barbieri I., Merenda M., Foni E. 2012. *J Virol. Methods.* 2012 184, 117-20

Clavijo A, Nikooienejad A, Esfahani MS, Metz RP, Schwartz S, Atashpaz-Gargari E, Deliberto TJ, Lutman MW, Pedersen K, Bazan LR, Koster LG, Jenkins-Moore M, Swenson SL, Zhang M, Beckham T, Johnson CD, Bounpheng M. (2012) “Identification and Analysis of the First 2009 Pandemic H1N1 Influenza Virus from U.S. Feral Swine” *Zoonoses Public Health.* 2012 Sep 17. doi: 10.1111/zph.12006. [Epub ahead of print]

Closa-Sebastià F., Casas-Díaz E., Cuenca R., Lavin S., Mentaberre G., Marco I.(2011) “Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia(NE Spain) *Eur. J. Wildl. Res.* 57:977-981

Cordioli P., Callegari S., Berlinzani A., Foni E., Candotti P., Barigazzi G.(1993) ”Indagine sierologica su cinchiali selvatici dell'Appennino Parmense” *Atti Della Società Italiana delle Scienze Veterinarie.* Riccione 29 Settembre- 2 Ottobre 1159-1162.

Corn, J.L., Cumbee, J.C., Barfoot, R., Erickson, G.A., 2009. Pathogen exposure in feral swine populations geographically associated with high densities of transitional swine premises and commercial swine production. *J. Wildl. Dis.* 45, 713–721.

De Boer G.F., Back W., Osterhaus A.D. (1990) "An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in human and various animal species" *Arch Virol.* 115,47-61.

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) 225-228

Foni E., Candotti P., Raffo A., Gamba D., Cataldi M., Barigazzi G.(1995) Utilizzo di ELISA Sandwich nella diagnosi di influenza suina a confronto con tecniche di isolamento virale. *Atti S.I.S.Vet.*, XLIX, 543-544.

Foni E., Chiapponi C., Sozzi E., Barbieri I., Moreno A.M., Merenda M., Luppi A., Alborali L., Cordioli P.(2010). Caratterizzazione di virus influenzali circolanti nel suino negli anni 2008-2009 in Italia. *Atti del XXXVI Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini.* Montichiari (Bs)

Germundsson, A., Madslie, K.I., Hjortaas, M.J., Handeland, K., Jonassen, C.M., 2010. Prevalence and subtypes of Influenza A Viruses in Wild Waterfowl in Norway 2006–2007. *Acta Vet. Scand.* 52, 28.

Gipson, P.S., Veatch, J.K., Matlack, R.S., Jones, D.P., 1999. Health status of a recently discovered population of feral swine in Kansas. *J. Wildl. Dis.* 35, 624–627.

Grog, 2010 Human Influenza infections surveillance. Available from: <<http://www.grog.org/cgi-files/dh.cgi> (accessed 23.05.11).

Hall, J.S., Minnis, R.B., Campbell, T.A., Barras, S., Deyoung, R.W., Pabilonia, K., Avery, M.L., Sullivan, H., Clark, L., McLean, R.G., 2008. Influenza exposure in United States feral swine populations. *J. Wildl. Dis.* 44, 362–368.

Kaden, V., Lange, E., Hänel, A., Hlinak, A., Mewes, L., Hergarten, G., Irsch, B., Dedek, J., Bruer, W., 2009. Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 153–159

Kaden, V., Lange, E., Starick, E., Bruer, W., Krakowski, W., Klopries, M., 2008. Epidemiological survey of swine influenza A virus in selected wild boar populations in Germany. *Vet. Microbiol.* 44, 362–368.

Kendall A.P., Pereira M.S., Skehel J.J. (1982) "Concepts and procedures for laboratory-based influenza surveillance". Atlanta, U.S. Department of Health and Human Service.

Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. and Higgins D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948)

Markowska-Daniel, I., 2003. Monitoring of swine influenza in Poland in the season 2001/2002. In: *Proceedings of the Fourth International Symposium on Emerging and Re-Emerging Pig Diseases*, Rome, Italy, pp. 277–278.

OIE- Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals , ed. 2010, Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.

Roic B, Jemersic L, Terzic S, Keros T, Balatinec J, Florijancic T. (2012) "Prevalence of antibodies to selected viral pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) in Croatia in 2005-06 and 2009-10" *J Wildl Dis.* 2012 Jan;48(1):131-7.

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.

Slomka MJ, Densham AL, Coward VJ, Essen S, Brookes SM, Irvine RM, Spackman E, Ridgeon J, Gardner R, Hanna A, Suarez DL, Brown IH (2010) "Real time reverse transcription (RRT)-polymerase chain reaction (PCR) methods for detection of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus and European swine influenza A virus infections in pigs". *Influenza Other Respi Viruses.* 2010 Sep;4(5):277-93. doi: 10.1111/j.1750-2659.2010.00149.x.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739)

Vengust, G., Valencak, Z., Bidovec, A., 2006. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *J. Veterinary Med. Ser. B* 53, 24–27.

Vicente, J., Leon-Vizcaino, L., Gortazar, C., Cubero, M.J., Gonzalez, M., Martin-Atance M., 2002. Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from south-central Spain. *J. Wildl. Dis.* 38, 649–652.

Webster, R.G., 1998. Influenza: an emerging disease. *Emerging Infect. Dis.* 4, 436

1. HA

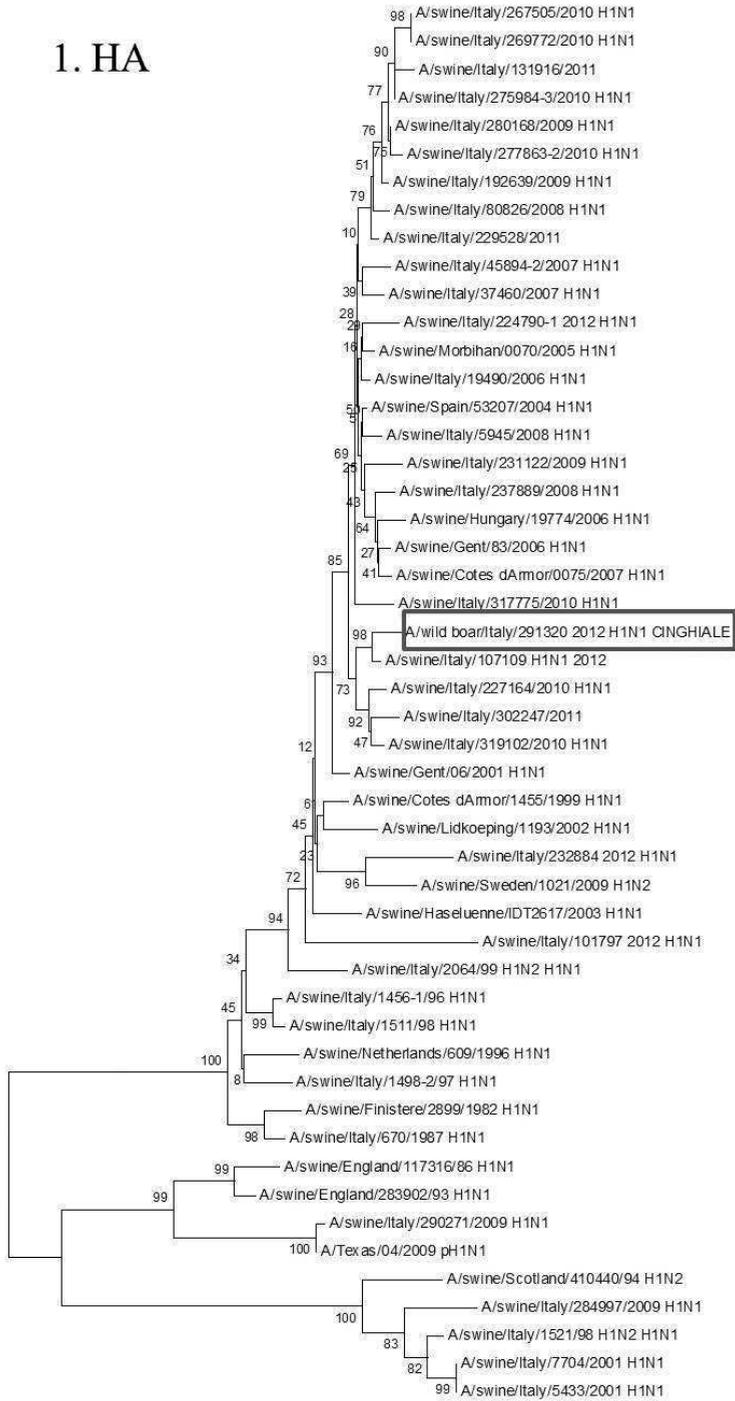


Figura. 1

2. NA

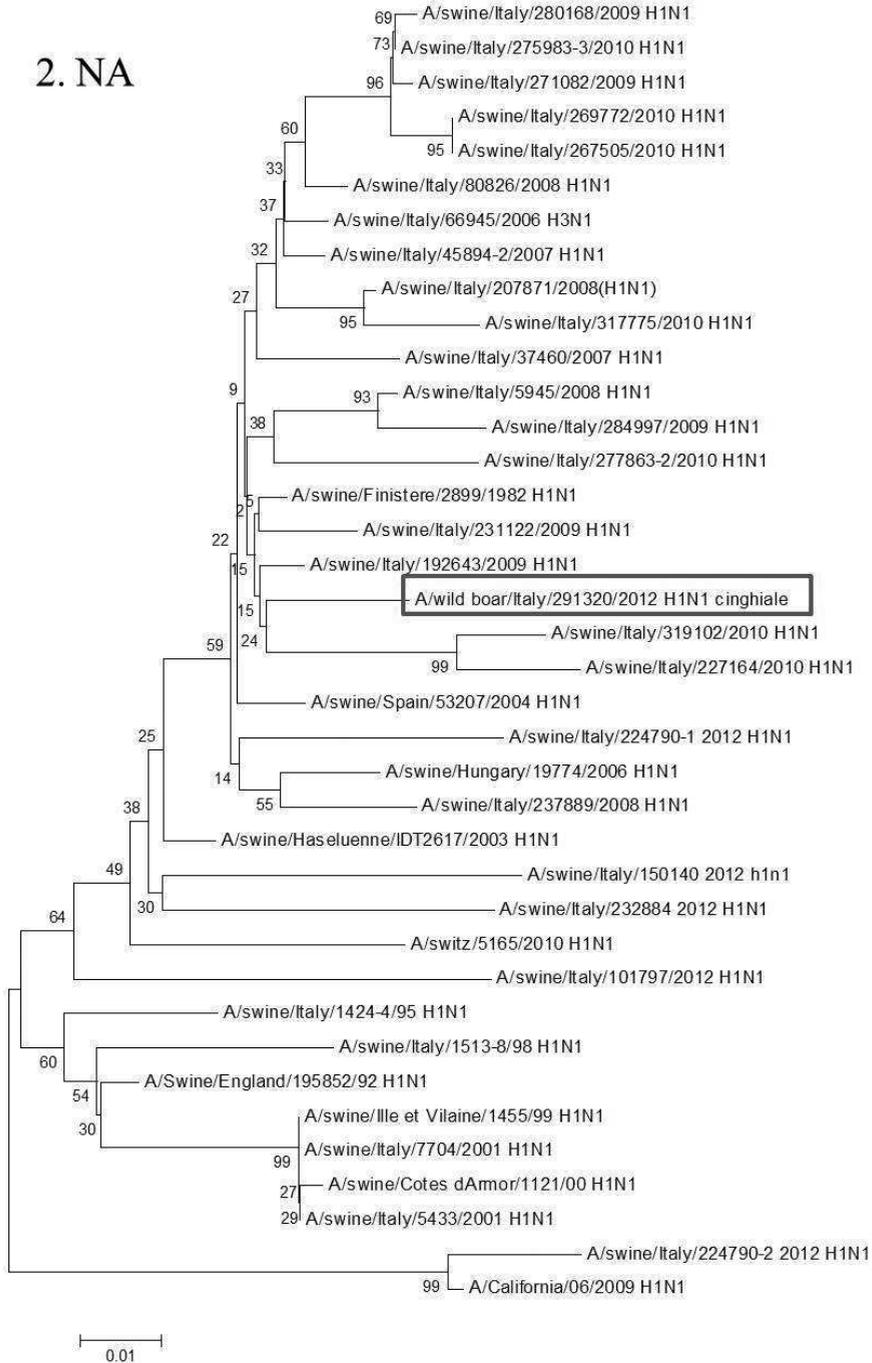
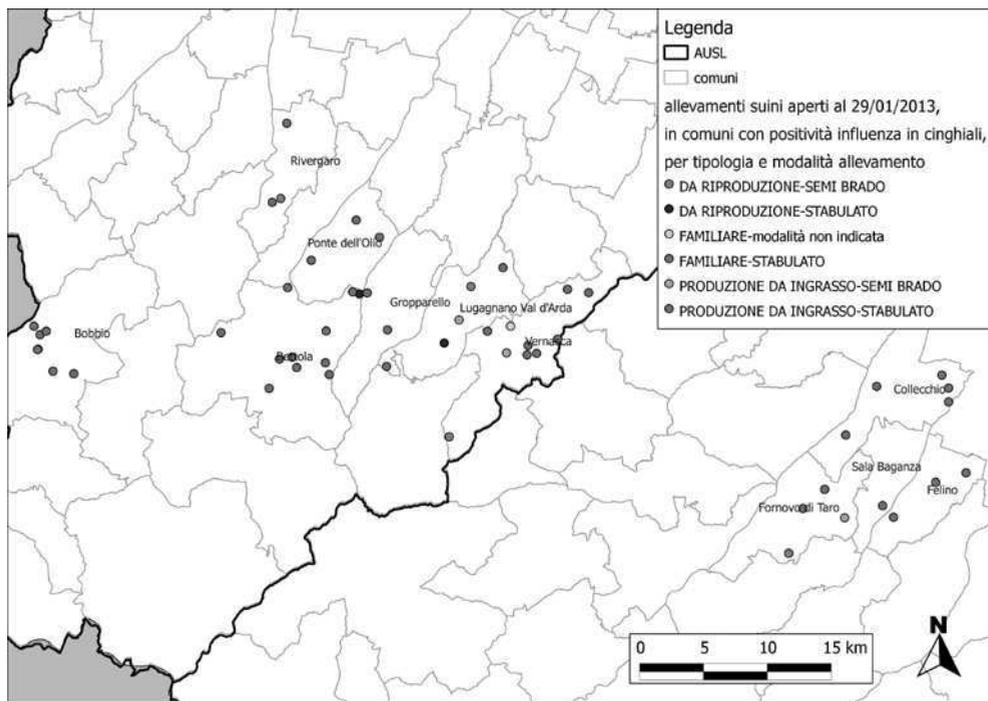


Figure. 1 e 2 Analisi filogenetica del gene codificante per HA e per NA del virus A/wild boar/ Italy/291320/2012. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il software MEGA5 con il metodo Neighbor-Joining con test bootstrap (1000 replicati) (Tamura et Al. 2011).



MONITORAGGIO DELLA MALATTIA DI AUJESZKY IN POPOLAZIONI DI CINGHIALI (SUS SCROFA) DELLA REGIONE VENETO

MONITORING OF AUJESZKY DISEASE IN WILD BOAR (SUS SCROFA) POPULATIONS OF THE VENETO REGION

DI MARTINO, G.¹, ZULIANI, F.², BUNIOLO, F.¹, GUERRINI E.², CITTERIO, C.³, GRANZOTTO, F.⁴, REBECCHI, L.⁵, ADAMI, S.⁶, GUBERTI, V.⁷, BONFANTI, L.¹

¹Staff Direzione Sanitaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD);

²Laboratorio di Diagnostica Virologica e sierologica,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD);

³SCT2 – sezione di Belluno, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD);

⁴ULSS 7 di Pieve di Soligo, Dipartimento di Prevenzione;

⁵ULSS 3 di Bassano, Dipartimento di Prevenzione;

⁶ULSS 22 di Bussolengo, Dipartimento di Prevenzione;

⁷Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma

Parole chiave: Aujeszky, cinghiale, sierologia, PCR, ganglio trigemino, *meat juice*

Key words: Aujeszky, wild boar, serology, PCR, trigeminal ganglia, meat juice

RIASSUNTO

La Malattia di Aujeszky (AD) è una malattia notificabile di rilevante impatto economico per il settore suinicolo. È sostenuta dal *Porcine herpesvirus 1*. Il cinghiale, quale *reservoir*, potrebbe rappresentare un costante pericolo per le popolazioni domestiche di reintroduzione della malattia in aree indenni. Per questo motivo risulta indispensabile che i piani di eradicazione della malattia prevedano il monitoraggio della malattia nelle popolazioni di cinghiali selvatici. La maggior parte degli Paesi comunitari ha raggiunto lo *status* di indennità o ha ottenuto il riconoscimento comunitario ai sensi del art. 9 della Dir. 64/432/CEE. La situazione nazionale non consente l'acquisizione dell'indennità se non in alcune particolari realtà territoriali, penalizzando economicamente il sistema produttivo a seguito delle limitazioni al commercio degli animali e dei prodotti derivati (produzioni DOP). Il presente lavoro è finalizzato alla valutazione delle positività sierologiche (su siero e *meat juice*) e virologiche (su tonsille e ganglio trigemino) nelle popolazioni di cinghiali della Regione Veneto. I risultati hanno evidenziato, su un totale di 140 cinghiali testati (52 in provincia di Treviso, 50 in provincia di Vicenza, 19 in provincia di Belluno e 19 in provincia di Verona), due sole positività virologiche su tonsilla, in soggetti tra uno e due anni di vita abbattuti nelle province di Treviso e Vicenza.

ABSTRACT

Aujeszky Disease (AD) is a notifiable disease with relevant economic impact in swine sector. It is caused by *Porcine herpesvirus 1*. The wild boar can act as a reservoir of the virus and has to be taken into account as a constant risk factor for the AD reintroduction in free areas. For this reason it is fundamental that the eradication plans include the monitoring of wild boar populations. Most of the Member States have achieved the EU AD Free Status or the acknowledgement in respect to the art. 9 of Directive 64/432/CEE. The national situation allows such achievement only in specific areas of the country, penalizing the economy of the productive system due to the trade limitations for animals and derived products (PDO or DOCG productions). The aim of this work was to investigate the Aujeszky status of the wild boar population living in the Veneto region

through serological (in serum and *meat juice*) and virological (in tonsils and trigeminal ganglia) test. Two out of 140 tested wild boars (52 in the province of Treviso, 50 in the province of Vicenza, 19 in the province of Belluno and 19 in the province of Verona) were found virus positive in the tonsils. Both animals belonged to the 1 to 2 years age class and were hunted in the provinces of Treviso and Vicenza.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico della Malattia di Aujeszky (AD) è il *Porcine herpesvirus 1* (ADV), un virus appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Alphaherpesvirinae*, genere *Varicellovirus* (Mettenleiter *et al.*, 2000). Gli ospiti naturali sono il cinghiale e il suino domestico, ma il virus può infettare, a eccezione di umani e primati, numerosi altri mammiferi, che risultano ospiti a fondo cieco sviluppando una patologia neurologica letale prima dell'escrezione virale (Fenner *et al.*, 1987). ADV è un virus altamente neurotropo che, dopo una primaria replicazione a livello di mucosa nasofaringea, tonsille e epitelio olfattorio, invade il sistema nervoso centrale attraverso le vie nervose delle tonsille e del tratto respiratorio superiore, ove può persistere in forma latente (Ruiz-Fons *et al.*, 2007). La latenza è uno stato in cui il DNA virale persiste ma non genera infezione. Le basi molecolari di tale meccanismo risultano ancora largamente sconosciute (Mettenleiter *et al.*, 2000). I principali siti di latenza sono il ganglio trigemino, il bulbo olfattorio, le tonsille (Mettenleiter *et al.*, 2000) e i gangli sacrali (Romero *et al.*, 2003). La AD rappresenta oggi una delle più importanti patologie del suino domestico a livello mondiale, inclusa nell'elenco OIE delle malattie notificabili (Müller *et al.*, 2011). La malattia nel cinghiale è caratterizzata da un decorso generalmente asintomatico, in base ai ceppi coinvolti (Meng *et al.*, 2009) e questa popolazione selvatica potrebbe rappresentare il *reservoir* della malattia (Ruiz-Fons *et al.*, 2008), ma il quadro complessivo del ruolo epidemiologico svolto dalle popolazioni selvatiche europee non è ancora completamente chiarito (Müller *et al.*, 2011): sebbene infezioni sperimentali abbiano dimostrato la possibile trasmissione del virus da suini domestici a cinghiali e viceversa (Müller *et al.*, 2001), in taluni episodi è stato escluso il ruolo di *reservoir* del cinghiale sulla base di differenze biomolecolari dei ceppi virali isolati dalle due popolazioni (Müller *et al.*, 1997). In altri casi ancora (Capua *et al.*, 1997) è stata dimostrata l'appartenenza del virus isolato da un cinghiale nel 1993 a un gruppo (gruppo I) non più rilevabile nei precedenti 10 anni nei suini domestici. Questa evidenza supporterebbe l'ipotesi del mantenimento del virus nelle popolazioni selvatiche successivamente alla sua scomparsa dal ciclo domestico. Nel cinghiale gli episodi con sintomatologia clinica risultano estremamente rari, il più rilevante dei quali è stato segnalato in un focolaio in Spagna da Gortazar *et al.* (2002), dove è stata evidenziata una mortalità del 14% nei giovani e del 7,5% negli adulti. La sintomatologia clinica osservata è stata caratterizzata da comportamento anomalo, atassia del treno posteriore, incoordinazione, tremori. Le lesioni macroscopiche consistevano in congestione a livello di tonsille, linfonodi, cervello, meningi e, solo in alcuni soggetti, petecchie emorragiche nell'intestino tenue ed edema polmonare; tutti gli animali avevano di recente ingerito cibo e non mostravano segni di prurito o automutilazioni. L'esame istopatologico rivelava moderata meningoencefalite non suppurativa. La trasmissione nel suino domestico avviene solitamente per via orofaringea a seguito di contatto con aerosol e secreti infetti, mentre nei suini selvatici e nei cinghiali la via principale di trasmissione sembrerebbe quella venerea (Romero *et al.*, 2003). A comprovare tale ipotesi vi sarebbe la maggiore prevalenza di positività in PCR nei gangli sacrali (56% su 16 gangli di suini selvatici infettatisi naturalmente) rispetto a quelli trigeminali (44% su 16 gangli trigeminali) e le tonsille (39% su 13 tonsille), analogamente a quanto si verifica per gli herpes umani, nei quali HSV-2 (genitale) sviluppa latenza più frequentemente nei gangli sacrali, mentre HSV-1 (labiale) in latenza è maggiormente localizzato nel ganglio trigemino (Romero *et al.*, 2003).

Il possibile ruolo epidemiologico del cinghiale selvatico pone degli interrogativi sul costante

pericolo di re-introduzione della malattia in popolazioni indenni (Müller *et al.*, 2011). Per questo motivo le linee guida comunitarie per i piani di eradicazione della malattia prevedono il monitoraggio delle popolazioni selvatiche e l'adozione di misure di biosicurezza per prevenire l'eventuale trasmissione della malattia (SANCO/3023/2008). La maggior parte degli Stati membri ha raggiunto lo status di indennità o ha ottenuto il riconoscimento comunitario ai sensi del art. 9 della Direttiva 64/432/CEE, relativa a problemi di polizia sanitaria in materia di scambi intracomunitari di animali delle specie bovina e suina, che prevede l'adozione obbligatoria di piani di controllo e eradicazione. La situazione nazionale non consente l'acquisizione dell'indennità se non in alcune particolari realtà territoriali (Bolzano) penalizzando economicamente il sistema produttivo nazionale a seguito delle limitazioni commerciali degli animali e dei prodotti derivati (produzioni DOP o DOCG). Come in altre realtà nazionali, sul territorio della Regione Veneto le popolazioni di cinghiali selvatici hanno subito negli ultimi decenni un'esplosione demografica che ha reso necessari interventi di depopolamento (Carnevali *et al.*, 2009). Ai fini sanitari, le carcasse dei cinghiali selvatici sono routinariamente sottoposte a ispezione da parte dei Servizi veterinari ufficiali e campioni di muscolo vengono inviati all'IZS per la ricerca di *Trichinella*. Il presente lavoro ha avuto come obiettivo il monitoraggio della malattia di Aujeszky nelle popolazioni selvatiche di cinghiali abbattuti nelle diverse province della Regione Veneto, attraverso indagine virologica su tonsille e ganglio trigemino e ricerca anticorpale su siero e *meat juice*.

L'analisi sierologica risulta spesso inficiata dalla scarsità e bassa qualità del siero ottenuto dal coagulo cardiaco. Al contrario, il prelievo di porzioni di muscolo è facilmente attuabile durante l'ispezione. Il *meat juice* è una matrice riconosciuta dalla normativa comunitaria per le analisi sierologiche, citata a esempio per la ricerca delle Salmonelle (Dec. 2006/668/CE), nonché utilizzata da tempo nella ricerca (Osterkorn *et al.*, 2001; Quirke *et al.*, 2001).

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata eseguita sugli animali abbattuti nelle province di Treviso, Vicenza, Belluno e Verona dal 12/2011 al 12/2012. I servizi veterinari responsabili delle verifiche sanitarie presso i centri di conferimento (Farra di Soligo, Cassola, Alano di Piave, Fumane) hanno garantito la raccolta delle diverse matrici. A ciascun capo è stata attribuita una classe di età, sulla base del tempo di eruzione dei molari nell'emiarcata inferiore (Matschke, 1967):

- A. Assenza di molari: meno di 6 mesi di vita
- B. 1 molare: 6 mesi-1 anno
- C. 2 molari: 1-2 anni
- D. 3 molari: più di due anni

Il siero è stato ottenuto per centrifugazione del coagulo cardiaco, raccolto immediatamente dopo l'abbattimento degli animali, trasportato a 4°C e analizzato con il kit Ingenasa Ingezim ADV total 1.1.ADV.K1; test ELISA di tipo non competitivo con diluizione prescritta per il siero di 1:25.

Per la preparazione del *meat juice* i campioni di massetere di circa 1×3 cm sono stati toelettati, eliminando grasso e porzioni aponeurotiche, sminuzzati con le forbici e posti in appositi supporti (Christensen ApS, Hillerød, Danimarca), poi stoccati a -20°C. Il successivo scongelamento ha favorito la separazione del *meat juice* in una provetta di raccolta (per alcuni campioni è stato necessario ripetere il ciclo congelamento/scongelamento più volte per ottenere una quantità di *meat juice* sufficiente per l'esecuzione delle prove. La quantificazione anticorpale è avvenuta mediante utilizzo dello stesso kit Ingenasa, validato *ad hoc* su *meat juice*. La diluizione d'uso ottimale è risultata essere 1:10 (Natale *et al.*, 2012).

L'estrazione delle tonsille e del ganglio trigemino è avvenuta secondo la procedura illustrata in Figura 1. Da queste matrici successivamente è stato estratto il DNA tramite il prodotto commerciale "High Pure PCR Template Preparation kit" per la ricerca di un frammento genico

di PHV-1 di circa 338 paia di basi (bp), tramite un protocollo di PCR end-point (Katz e Petersen, 1992). In particolare, il bersaglio della reazione è costituito da un frammento genico localizzato nel porzione genomica US8, codificante la glicoproteina gE virale. La scelta di questa regione è voluta in quanto, essendo deleta nei vaccini marker (gE-), consente una più diretta diagnosi differenziale tra animali vaccinati e soggetti infetti da virus *wild type*.

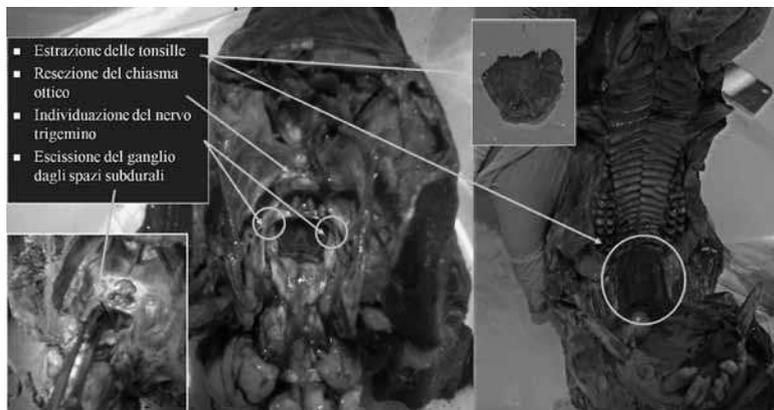


Figura 1. Estrazione delle tonsille e dei gangli trigeminali dall'encefalo di cinghiale.
Figure 1. Removal of tonsils and trigeminal ganglia from the encephalon of wild boar.

RISULTATI

I risultati del monitoraggio sierologico e virologico dei cinghiali delle diverse province della Regione Veneto, stratificati per sesso e classe di età, sono indicati in Tabella 1. Si evidenziano due positività in PCR su tonsilla in animali abbattuti nelle province di Treviso e Vicenza. La distribuzione territoriale delle aree di caccia testate e di quelle risultate positive sono indicate in Figura 2.

Categoria	Sesso	TV	VI	BL	VR	+Siero	+Meat juice	+PCR ganglio	+PCR tonsilla	Totale
A	M	3	-	1	1	0	0	0	1	5
	F	-	-	1	1	0	0	0	0	2
B	M	6	3	4	4	0	0	0	0	17
	F	7	8	1	3	0	0	0	1	19
C	M	13	17	2	4	0	0	0	0	36
	F	13	15	5	2	0	0	0	0	35
D	M	4	2	2	1	0	0	0	0	9
	F	6	5	3	3	0	0	0	0	17
Totale		52	50	19	19	0	0	0	2	140

Tabella 1. Risultati del monitoraggio sierologico e virologico (PCR) per AD su cinghiali abbattuti in diverse province della Regione Veneto nel corso del 2012, stratificati per sesso e classe di età.

Table 1. Results of the serological and virological (PCR) monitoring of AD in wild boars culled in different provinces of the Veneto Region during 2012, stratified by gender and age class.

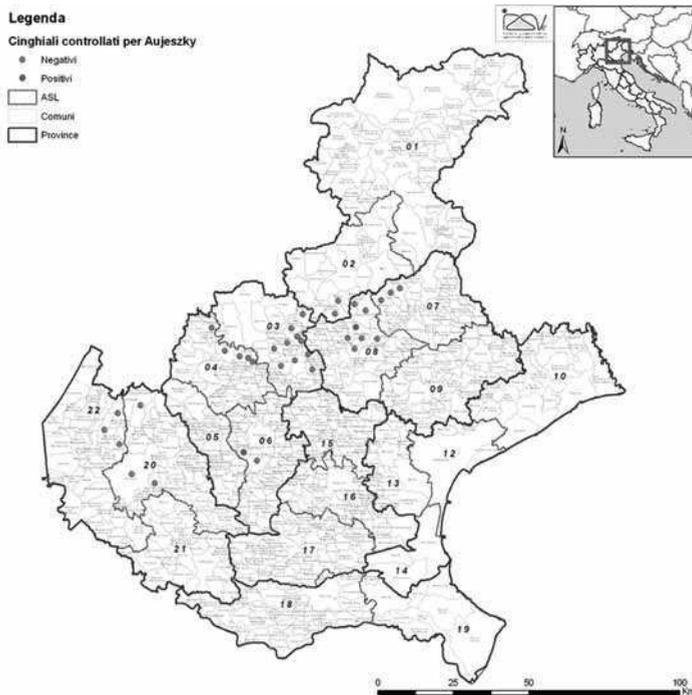


Figura 2. Distribuzione territoriale delle aree di caccia testate e di quelle risultate positive al monitoraggio sierologico e virologico per AD su cinghiali abbattuti nel corso del 2012.

Figure 2. Spatial distribution of the tested and positive hunting areas within the serological and virological monitoring of AD in wild boars culled during 2012.

DISCUSSIONE

Il ruolo del cinghiale selvatico quale possibile *reservoir* della malattia è stato ampiamente indagato nel corso degli ultimi 10 anni in Europa, evidenziando livelli di prevalenza estremamente vari, dallo 0,3% al 66%, assenza solo in Svezia e Lituania (Müller *et al.*, 2011). I territori della Germania orientale risultano i maggiormente studiati ed evidenziano prevalenze superiori al 40% su un campione di circa 100.000 cinghiali testati nel corso di 24 anni (Müller *et al.*, 2011). Per quanto riguarda il territorio italiano i dati disponibili sono relativi al territorio della regione Sardegna: su 2379 sieri raccolti nel periodo 1994-1995 si rileva una elevata prevalenza dell'infezione (41,8%) (Oggiano *et al.*, 1997). Dati più recenti relativi alla regione Toscana, nel periodo 2002-2003, evidenziano su 152 animali una positività sierologica del 51% e una positività in PCR su tonsille del 41% (Lari *et al.*, 2006). Dati relativi alla regione Emilia Romagna riportano, sugli 8.238 cinghiali abbattuti nelle stagioni venatorie 2006-2010, positività sierologiche dal 21,6% al 35,2% (Rugna *et al.*, 2011). Infine dati relativi alla regione Lombardia mostrano sieroprevalenze del 29% su 2.153 soggetti nel 2009 (Cordioli, 2009).

Sulla base dei dati raccolti e la continuità territoriale, si era ipotizzata, per la Regione Veneto, una prevalenza simile a quella evidenziata in Regione Lombardia, in particolare nell'area dei Monti Lessini (nord della Provincia di Verona). Per contro i risultati sono in accordo con un precedente studio che, nel biennio 2005-2007, non aveva evidenziato positività su

79 cinghiali abbattuti nella provincia di Treviso (Salvador, 2011). Anche il campionamento effettuato nel 2008 su 215 cinghiali dei Colli Euganei non aveva rilevato positività (Drigo *et al.*, 2009). Tale sieronegatività poteva essere motivata dal fatto che i prelievi in tali aree geografiche erano stati effettuati su popolazioni chiuse (parchi regionali), ovvero originate da piccoli nuclei di individui negativi di recente introduzione.

Le ricerche hanno inoltre indagato la possibile correlazione tra età e sesso degli animali e le positività. La maggior parte degli studi evidenzia tassi di infezione significativamente più alti negli adulti rispetto a giovani e suinetti (Müller *et al.*, 2011); secondo Ruiz-Fons *et al.* (2007) sebbene siano evidenziabili virusprevalenze maggiori in femmine e soggetti di età superiore ai 2 anni, tali differenze non risultano statisticamente significative. Lari *et al.* (2006) individuano in Toscana differenze significative di prevalenza nei soggetti di età inferiori a un anno (15% positivi PCR; 16% positivi ELISA) e di età superiore (55% positivi PCR; 67% positivi ELISA), ma non identificano significatività legate al sesso. Differenze significative legate al sesso sono state individuate in Spagna (Vicente *et al.*, 2005), Tunisia (Jridi *et al.*, 1996) e Germania (Lutz *et al.*, 2003), con sieroprevalenze più elevate nelle femmine. Infine Vicente *et al.* (2005) evidenziano nelle femmine una sieroprevalenza costante nel corso dell'anno, mentre nei maschi questa sembra aumentare in corrispondenza della stagione riproduttiva. Le differenze legate al sesso possono, secondo questi ultimi autori, avere due motivazioni: i maschi raggiungono più tardivamente la maturità sessuale e lasciano il gruppo materno per condurre vita solitaria; viceversa le femmine con il loro comportamento gregario favoriscono la trasmissione della malattia per via respiratoria. Per quanto riguarda l'effetto età bisogna infine considerare l'aumento di sieroprevalenza legato anche a una maggiore probabilità di esposizione a ADV (Ruiz-Fons *et al.*, 2007).

Nel presente studio sono risultati positivi due soggetti tra 1 e 2 anni di vita in PCR su tonsilla ma negativi sulle altre matrici. Questo dato sembrerebbe indicativo di una infezione recente, che non ha ancora prodotto risposta anticorpale né eventuale latenza sul ganglio trigemino. Un'altra ipotesi potrebbe essere che il virus sia entrato in latenza nelle tonsille senza dare risposta anticorpale, per lo meno non IgG (potrebbero essere state prodotte solo IgA).

CONCLUSIONI

Nel mondo globalizzato la presenza di infezioni/malattie negli animali rappresenta una delle possibili motivazioni al blocco degli scambi commerciali. In un tale contesto i progetti di sorveglianza sanitaria sulla fauna selvatica non hanno la funzione di focalizzare le malattie che colpiscono i selvatici, ma piuttosto individuare il più precocemente possibile la presenza endemica (o l'introduzione recente) di infezioni in grado di provocare ingenti danni economici al comparto zootecnico o all'industria alimentare. Lo scopo è conoscere la situazione epidemiologica dei territori di produzione per prevenire l'introduzione delle infezioni nel comparto produttivo e quindi annullare i danni diretti e gestire le eventuali limitazioni imposte alle movimentazioni di derrate alimentari. AD è una delle infezioni riconosciute internazionalmente e la cui presenza nel territorio può condizionare pesantemente la commercializzazione sia degli animali recettivi sia delle derrate alimentari da loro originate. Il presente studio dimostra come la situazione epidemiologica di AD nel cinghiale a livello regionale rappresenti un rischio relativamente basso per gli allevamenti suini della regione. Dall'indagine è stato comunque possibile individuare due piccoli focolai in due distinte province; il virus sembra quindi circolare, in modo focale, in piccole popolazioni di cinghiale piuttosto che assumere un andamento pan-regionale. Se così fosse, la popolazione di maiali a rischio non sarebbe quella del comparto industriale ma piuttosto i gruppi di suini domestici il cui allevamento è indirizzato alle piccole produzioni locali, incluso l'allevamento semi-brado

in aree boschive. Una volta definitivamente accertata tale situazione epidemiologica le piccole produzioni locali andranno protette innanzitutto studiando accuratamente la distribuzione regionale di AD nel cinghiale e nel contempo aumentando i livelli di biosicurezza laddove la distribuzione geografica dell'allevamento suino e del cinghiale infetto è sovrapposta.

BIBLIOGRAFIA

- Capua I., Casaccia C., Calzetta G., Caporale V. (1997) "Characterisation of Aujeszky's disease viruses isolated from domestic animals and from a wild boar (*Sus scrofa*) in Italy between 1972 and 1995". *Vet. Microbiol.* 57,143-149.
- Carnevali L., Pedrotti L., Riga F., Toso S. (2009) "Banca Dati Ungulati: status, distribuzione, consistenza, gestione e prelievo venatorio delle popolazioni di Ungulati in Italia". Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Report 2001-2005.
- Cordioli P. (2009) Relazione tecnica sull'attività del Centro di Referenza Nazionale per la Malattia di Aujeszky nel 2009. www.izsler.it/izs_bs/allegati/820/RELAZIONE%202009.pdf
- Decisione 2006/668/CE Della Commissione del 29 settembre 2006 "relativa a un contributo finanziario della Comunità per un'indagine di riferimento sulla diffusione della Salmonella nei suini da macello da realizzare negli Stati membri".
- Drigo M., Lucchese L., Menandro M.L., Pasotto D., Gallo M., Ziron G., de Mateo Aznar M., Martini M. (2009) "Prevalenza di alcuni agenti patogeni in cinghiali del Parco Regionale dei Colli Euganei". In: *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie*, 63, 126-128.
- Gortazar C., Vicente J., Fierro Y., Leon L., Cubero M.J., Gonzalez M. (2002) "Natural Aujeszky's disease in a Spanish wild boar population". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 210-212.
- Jridi M., Bouzghaia H., Toma B. (1996) "Aujeszky's disease in wild boar in Tunisia. *Epidemiol et Sante Anim* 30:99-105
- Lari, A., Lorenzi, D., Nigrelli, D., Brocchi, E., Faccini, S. & Poli, A. 2006 Pseudorabies virus in European wild boar from central Italy". *J. Wildl. Dis.* 42, 319-324.
- Katz J.B., Petersen J.C. (1992). Molecular analysis of Pseudorabies viral vaccines and their rapid differentiation from wild type isolates using DNA-amplified glycoprotein I and thymidine kinase gene segment polymorphisms. *Biologicals* 20, 187-195.
- Lutz W., Junghans D., Schmitz D., Müller T. (2003). "A long-term survey of pseudorabies virus infections in European wild boar of western Germany". *Z Jagdwiss* 49,130-140.
- Matschke G.H. (1967). "Aging European Wild Hogs by Dentition". *The Journal of Wildlife Management* 31(1), 109-113.
- Meng X.J., Lindsay D.S., Sriranganathan N. (2009). "Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans". *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2697-2707.
- Mettenleiter T.C. (2000). "Aujeszky's disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis-State of the art, June 1999". *Vet. Res.* 31, 99-115
- Müller T., Teuffert J., Zellmer K., Staubach C., Klupp B., Otte J., Conraths F.J. (1997). "Pseudorabies virus infections in the European wild boar – A potential danger for domestic pigs?" *Epidemiologie Sante` Animale* 01, 31-32.
- Müller T.F., Teuffert J., Zellmer R., Conraths F.J. (2001). "Experimental infection of European wild boar and domestic pigs with pseudorabies viruses with differing virulence". *American Journal of Veterinary Research* 62, 252-258.
- Müller T., Hahn E.C., Tottewitz F., Kramer M., Klupp B.G., Mettenleiter T. C., Freuling C. (2011). "Pseudorabies virus in wild swine: a global perspective". *Arch Virol* 156, 1691-1705.
- Natale A., Zuliani F., Di Martino G., Lucchese L., Gagliazzo L., Chisini Granzotto F., Sandonà C., Bonfanti L. (2012). "Utilizzo del meat juice per la sierologia della malattia di Aujeszky nel cinghiale". In: *Atti del XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento (NA), 24-26 Ottobre 2012, pp 58-61.*

- Oggiano A., Sarria A., Cabras P., Manca A.F., Madrau P., Dei Guidici S. (1997) "Epidemiological Survey of Aujeszky's Disease in free Ranging Pigs of Sardinia". Atti Della Societa Italiana Delle Scienze Veterinarie LI:305-306.
- Osterkorn K., Czerny C.P., Wittkowski G., Huber M. (2001) "Sampling plan for the establishment of a serologic *Salmonella* surveillance for slaughter pigs with meat juice ELISA". Berl. Münch. Tierärztl. Wschrift 114, 30-34.
- Quirke A.M., Leonard N., Kelly G., Egan J., Lynch P.B., Rowe T., Quinn P.J. (2001) "Prevalence of *Salmonella* serotypes on pig carcasses from high-and low-risk herds slaughtered in three abattoirs". Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr 114, 360-362.
- Romero C.H., Meade P.N., Homer B.L., Shultz J.E., Lollis G. (2003). "Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine". J Wildl Dis 39, 567-575.
- Rugna G., Bonilauri P., Frasnelli M., Garbanino C., Gelmetti D., Grazioli S., Licata E., Massi P., Pacciarini M.L., Pongolini S., Sozzi E., Tamba M., Vicari M., Merialdi G. (2011). "The monitoring of health status of wild boar (*Sus scrofa*) population in Emilia-Romagna Region. Results of years 2006-2010". In: Atti del XXXVII Meeting Annuale S.I.P.A.S. - Piacenza, 24-25 Marzo 2011.
- Ruiz-Fons F., Vidal D., Hofle U., Vicente J., Gortazar C. (2007). Aujeszky's disease virus infection patterns in European wild boar. Vet. Microbiol. 120, 241-250.
- Ruiz-Fons F., Segales J., Gortazar C. (2008). "A review of viral diseases of the European wild boar: effects of population dynamics and reservoir role". Vet. J. 176, 158-169.
- Salvador S. (2011) "Aspetti epidemiologici di alcune malattie del cinghiale (*Sus scrofa*) nel trevigiano" Tesi di Laurea Specialistica in Scienze Animali. Università degli Studi di Udine. SANCO/3023/2008, Guidance to Commission Decision 2008/185/EC regarding additional guarantees in intra-Community trade of pigs related to Aujeszky's disease and criteria for listing a Member State or a region thereof as free from Aujeszky's disease or as having an approved disease control programme. Brussels, December 2009.
- Vicente J., Ruiz-Fons F., Vidal D., Höfle U., Acevedo P., Villanúa D., Fernández-de-Mera I.G., Martín M.P., Gortázar C. (2005). Serosurvey of Aujeszky's disease virus infection in European wild boar in Spain. Veterinary Record 156, 408-412.

INDAGINE SULLO STATO SANITARIO DI ALLEVAMENTI UMBRI OUTDOOR ATTRAVERSO MONITORAGGIO SIEROLOGICO

A SEROLOGIC SURVEY ON HEALTH STATUS OF OUTDOOR PIG FARMS IN UMBRIA REGION

S. COSTARELLI¹, A. CAPORALI¹, C. PELLEGRINI¹, M. PANICCIA¹,
G. PAUSELLI², L. MORICONI², R. GIANNELLI³, M. BONI³, M. SENSI¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche;*

² *ASL 1 Umbria;*

³ *ASL 2 Umbria*

Parole chiave: stato sanitario, allevamento suino outdoor,

Key Words: health status, pig, outdoor farms

RIASSUNTO

La suinicoltura in Umbria ricopre un ruolo particolarmente rilevante nell'ambito del comparto zootecnico regionale, sia per l'elevata incidenza sulla produzione lorda vendibile (PLV), sia per la tradizione storica di questo tipo di allevamento, testimoniata da numerosi prodotti in ambito regionale e dalle numerose imprese operanti nel settore della trasformazione della carne suina. Si comprende pertanto come, in questo contesto, possano suscitare notevole interesse tipologie di allevamento alternative come l'allevamento suinicolo all'aperto, caratterizzato da basso impatto ambientale e basso impiego di capitali, adatto anche ad aree montane e marginali, con capacità di produrre a costi competitivi carni di alta qualità.

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare lo stato sanitario degli allevamenti umbri outdoor attraverso un monitoraggio sierologico che considerasse le più importanti infezioni dell'allevamento suino.

88 sieri appartenenti a 23 allevamenti sono stati saggiati per Peste Suina Classica (PSC), Malattia Vescicolare Suina (MVS), Brucellosi, Toxoplasmosi, Virus della Pseudorabbia (PRv), presenza di anticorpi vaccinali al PRv, Porcine Reproductive Respiratory Sindrome Virus (PRRSV), Porcine Circovirus di tipo 2 (PCV2), Swine Influenza Virus (SIV) e Clamidiosi. I risultati dimostrano sieronegatività per PSC, MVS, Brucella spp. in tutte le aziende saggiate. Il 65% degli allevamenti controllati sono risultati positivi per PCV2 e Toxoplasmosi, il 13% per SIV, il 35% per PRRS, il 4% per Chlamydia spp., il 17% per PRv. Il 43% degli allevamenti è vaccinato per PRv.

ABSTRACT

In Umbria region, pig farming plays a particularly significant role in the livestock sector, both for the high incidence on gross marketable production (PLV), and for the historical tradition of this type of farming, as demonstrated by a quite high number of typical regional products and by companies operating in the processing chain of pork meat.

In this scenario, it is easy to understand how alternative types of pig keeping, such as outdoor system, can get considerable interest. Outdoor pig farming is characterized by low environmental impact and low levels of necessary financial resources. It is, also, suitable for the use and/or recovery of mountain and/or marginal areas, making them competitive in high-quality meat production.

The aim of this work was to verify the health status of outdoor pig-farms, in Umbria Territory, through a serological monitoring of the most important infections of pigs. 88 sera from 23 farms were tested for Classical Swine Fever (CSF), Swine Vesicular Disease (SVD), Brucellosis, Toxoplasmosis, Pseudorabies virus (PRV), the presence of antibodies to PRV vaccine, Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus (PRRSv), Porcine Circovirus type 2 (PCV2), Swine Influenza Virus (SIV) and Chlamydia. The results showed seronegativity against CSF, SVD, Brucella spp. in all monitored pig holdings. On the contrary, 65% of the tested farms resulted positive for toxoplasmosis, 13% for SIV, 35% for PRRSv, 4% for Chlamydia spp., 17% for PRV.

INTRODUZIONE

L'allevamento all'aperto su vasta scala dei suini riproduttori rappresenta una delle soluzioni di stabulazione più innovative a livello europeo. I primi allevamenti di questo tipo sono stati realizzati in Inghilterra negli anni cinquanta ma è dalla fine degli anni ottanta che questa tipologia di allevamento ha cominciato a riscuotere sempre maggiore interesse.

Le ragioni di questa crescente attenzione sono diverse: da una parte la pressione crescente dei movimenti ambientalisti e animalisti che ha finito con il comportare ingenti costi per la gestione dei liquami zootecnici e per interventi di ristrutturazione volti a garantire il benessere dei suini; dall'altra l'aumentato costo di gestione delle attrezzature e degli impianti zootecnici sia in termini di manodopera, sia come fonti energetiche impiegate.

L'allevamento all'aperto, oltre a migliorare il benessere degli animali, implica alcuni aspetti positivi in materia di impatto ambientale: non comporta alcuna produzione di liquami; richiede un rapporto equilibrato tra superficie agricola aziendale e peso vivo allevato; permette inoltre una valorizzazione dei terreni, soprattutto se marginali, alternando su di essi l'allevamento con altre colture (rinnovo, cereali, prato).

Per i suinicoltori il vantaggio principale è costituito dalla possibilità di avviare un allevamento suinicolo con investimenti minimi in termini di strutture, impianti e attrezzature, indicativamente intorno al 20- 30% di quelli necessari per un allevamento intensivo "al chiuso".

In Umbria, gli allevamenti outdoor registrati in BDN nel 2011 erano oltre 100 unità. Essi possono costituire una fonte di reddito non marginale e, in prospettiva, rappresentano quell'obiettivo di estensivizzazione delle produzioni zootecniche che i Piani di Sviluppo Rurale auspicano da tempo.

Un'altra considerazione che deve essere fatta è la massiccia presenza del cinghiale nei nostri territori, presenza che nell'ultimo decennio ha fatto registrare un trend in costante aumento numerico, in linea con quanto si sta verificando in numerose altre aree geografiche europee. Il censimento del 2005 riporta una stima numerica di oltre 23.000 capi, molto al di sopra degli 8000 capi stimati nel censimento del 1996.

In questo contesto non si può ignorare il rischio che l'allevamento suino outdoor possa rappresentare un potenziale fattore di diffusione di alcune infezioni che dalle specie selvatiche possono passare a quelle domestiche e/o viceversa.

Questo contributo nasce con l'intenzione di descrivere la realtà zootecnico-sanitaria di alcuni allevamenti outdoor della regione Umbria. Abbiamo pensato di utilizzare i sieri prelevati dai colleghi del Servizio Veterinario in occasione del Piano di Sorveglianza della Malattia Vesicolare Suina. Pertanto ogni siero è stato saggiato per svelare la presenza di anticorpi non solo nei confronti del virus della MVS ma anche di altri agenti infettivi. Al momento del prelievo è stata compilata una "scheda informativa" utile a chiarire alcune caratteristiche ambientali e strutturali dell'allevamento.

MATERIALI E METODI

Abbiamo coinvolto i colleghi del Servizio Veterinario con l'obiettivo di approfondire le conoscenze sullo stato sanitario e sulle condizioni zootecnico-ambientali degli allevamenti outdoor presenti nella nostra realtà. Abbiamo individuato il prelievo da effettuare per il controllo previsto dal Piano di Sorveglianza della Malattia Vescicolare come la migliore occasione di ingresso in allevamento.

Per ogni azienda sottoposta a controllo, è stata allestita un'apposita "scheda informativa" (Fig. 1), compilata dai colleghi delle AA.SS.LL. al momento del prelievo, che ha avuto lo scopo di approfondire la conoscenza sulla tipologia delle aziende saggiate.

I sieri prelevati sono stati saggiati per la presenza di anticorpi nei confronti dei seguenti agenti patogeni:

- Virus della Peste Suina Classica (PSC)
- Virus della Malattia Vescicolare Suina
- Virus della Malattia di Aujeszky o Pseudorabbia (PRv)
- Virus dell'Influenza Suina (SIV)
- Virus della Porcine Reproductive Respiratory Sindrome (PRRSv)
- Chlamidia spp.
- Toxoplasma
- Brucella spp.
- Porcine Circovirus di tipo 2 (PCv2)
- Presenza di anticorpi vaccinali per il virus della Malattia di Aujeszky

Le tecniche analitiche utilizzate per ciascun tipo di accertamento sierologico sono riportate nella tabella 1.

Tab. 1: infezioni e tecniche analitiche utilizzate	
Tab. 1: Agents and serological techniques used	
INFEZIONE	TECNICA ANALITICA
Brucella spp.	SAR e FdC
MVS	ELISA (Kit del CRN Brescia)
PSC	ELISA (Kit del CRN Perugia)
PRv	ELISA (Idexx ®)
Anticorpi vaccinali per PRv	ELISA (Idexx ®)
Influenza suina	HAI
PRRS	ELISA (Idexx ®)
Circovirus	ELISA (Ingenasa®)
Clamidiosi	FDC
Toxoplasmosi	ELISA (Idvet®)

SAR: Siero Agglutinazione Rapida (Rosa Bengala Test)

FDC: Fissazione del Complemento

HAI: inibizione dell'emoagglutinazione

CRN: Centro di Referenza Nazionale

N. ACCETTAZIONE IZS

SUIDI DOMESTICI E SELVATICI DEL TERRITORIO UMBRO-MARCHIGIANO*
Controlli in suini allevati in stato brado e semi brado (campionamento contestuale a prelievo MVS)

Data prelievo: ___/___/___

Denominazione azienda: _____ Cod. Allevamento: _____

N.	Identificativo capo	Sesso		Età in mesi	Peso in kg
		F	M		
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

1) Rimonta: Esterna Interna

2) Presenza cucciolate miste: Si No

3) Ricovero chiuso: Si No

4) Recinzione muro: Si No

5) Recinzione rete: Si No

6) Aborto negli ultimi 6 mesi: Si No
a. Numero aborti: n. _____

7) Contatto con animali selvatici: Si No
a. Quali selvatici? Cinghiali Lepri Daini/Caprioli _____

8) Area in cui è situata l'azienda: Urbana Periurbana Rurale

9) Vicinanza grosse vie di comunicazione: Si No

Nome veterinario: _____

Fig. 1: Scheda utilizzata per la raccolta delle informazioni.

RISULTATI

Ad oggi, sono stati sottoposti a campionamento 23 allevamenti outdoor per un totale di 88 animali.

Nella Figura 2 è riportata la georeferenziazione delle aziende out-door saggiate.

Nella figura 3 si può apprezzare la concentrazione e distribuzione di cinghiali abbattuti durante la stagione venatoria del 2011-2012.



Fig. 2: Georeferenziazione aziende out-door saggiate

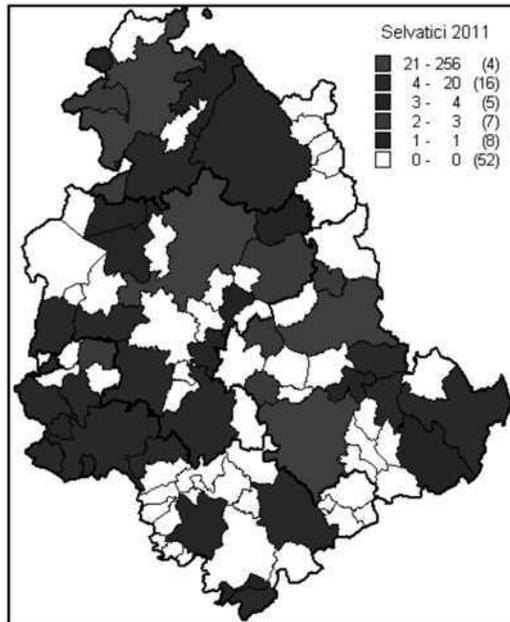


Fig. 3: distribuzione e concentrazione dei cinghiali abbattuti nella stagione venatoria 2011-2012

I dati desunti dall'elaborazione delle schede hanno evidenziato che la maggior parte delle aziende saggiate (83%) insiste in aree rurali, lontano da strade di grande comunicazione. In un'elevata percentuale di casi (78%) ci sono le condizioni per un possibile contatto con specie selvatiche che si identificano soprattutto in cinghiali, caprioli e lepri (Tab. 3). Sono molti gli allevatori che ricorrono alla rimonta interna (74%) ma, nello stesso tempo, la presenza di cucciolate miste, derivanti da accoppiamenti accidentali con cinghiali selvatici, è stata evidenziata, almeno una volta, nel 48% degli allevamenti (Tab. 2).

Tab. 2: informazioni desunte dalle schede informative										
Tab. 2: data from farms check list										
	Potenziali contatti con specie selvatiche		Tipo di Rimonta		Presenza cucciolate miste (viste almeno 1 volta)		Tipologia di ricovero		Dislocazione azienda	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
SI	18	78%								
NO	5	22%								
ESTERNA			6	26%						
INTERNA			17	74%						
SI					11	48%				
NO					11	48%				
N.S.					1	4%				
APERTO							14	61%		
CHIUSO							8	35%		
N.S.							1	4%		
RURALE									19	83%
PERIURBANA									4	17%

Legenda: NS = Non Specificato

Tab. 3: specie selvatiche presenti nello stesso territorio			
Tab. 3: sympatric wildlife			
Quali selvatici	N°	%	
Cinghiali, Daini	1	4%	
Cinghiali, Lepri	4	17%	
Cinghiali, Lepri, Daini	6	25%	
Cinghiali, Lepri, Fagiani	2	8%	
Fagiani	1	4%	
Fagiani, Lepri	1	4%	
Lepri	1	4%	
Lepri, Daini	1	4%	
Lepri, Daini, Cinghiali	1	4%	
N.s.	5	22%	

I risultati relativi alla percentuale di aziende risultate positive per ogni agente infettante esaminato sono riassunti nella tabella 4.

Tab. 4: N° di aziende positive per ciascuna infezione e relative percentuali		
<i>Tab. 4: number and percentage of positive farms</i>		
	AZIENDE POSITIVE	
	N°	%
Brucella spp.	0	0
MVS	0	0
PSC	0	0
PRv	4	17%
Anticorpi vaccinali per PRv	10	43%
Influenza suina	3	13%
PRRSv	8	35%
PCV2	15	65%
Clamidiosi	1	4%
Toxoplasmosi	15	65%

DISCUSSIONE

Le schede informative hanno evidenziato che gli allevamenti umbri outdoor sono realtà di poche decine di capi, localizzati in aree rurali, in prossimità di zone boschive. Le strutture di confinamento sono di fattura semplice costituite da reti raramente dotate di dispositivi elettrici. La presenza di cucciolate miste, evidenziata dal 48% degli allevatori almeno una volta, dimostra che il contatto con i cinghiali è un'evenienza tutt'altro che rara.

Alla luce di queste considerazioni ci sembra necessario premettere che, volendo dare un'interpretazione complessiva dei risultati ottenuti negli allevamenti outdoor, lo stato sanitario di specie selvatiche e, soprattutto, dei cinghiali del territorio in esame, non può essere ignorato. Tutti gli allevamenti outdoor da noi esaminati sono risultati negativi agli accertamenti sierologici per **Peste Suina Classica, Malattia Vescicolare Suina e Brucellosi**.

Mentre per le prime due patologie l'attuazione decennale di specifici piani di sorveglianza motiva lo stato di indennità degli allevamenti, per la brucellosi si è trattato della prima occasione di monitoraggio su allevamenti suini all'aperto.

Nelle stagioni venatorie 2009-2011 un'indagine sierologica che ha coinvolto oltre 1200 cinghiali, abbattuti nella nostra regione, ha fatto registrare diverse positività sierologiche in SAR e FDC a Brucella spp.. In un soggetto è stata isolata Brucella suis biovar 2. Pertanto l'infezione brucellare nei suidi selvatici, in Umbria, è presente. Tuttavia i valori di sieroprevalenza più elevati sono stati dell'1,02% (I.C. 95%: 0,37% - 2,5%) (Costarelli, 2012), valore indubbiamente più contenuto di quanto evidenziato in altre regioni italiane (Gennero et al., 2004; Gennero et al., 2006; Dondo et al. 2003; Bergagna et al., 2009;).

Inoltre controlli sierologici in SAR e FDC per Brucella spp. effettuati su oltre 245 minilepri (Battistacci et al., 2008) e su 150 lepri in occasione delle stagioni venatorie 2008-2010 (dati non pubblicati) hanno dato esito negativo.

I nostri risultati sui suini allevati all'aperto si inseriscono, pertanto, in un contesto territoriale in cui l'infezione brucellare appare contenuta e, pur nella loro esiguità, questi risultati sembrano darne una conferma indiretta.

Le sieropositività per **PRv** registrate nel 17% degli allevamenti outdoor saggiati confermano che la Malattia di Aujeszky è ancora una realtà diffusa dell'allevamento suino. Del resto, alla fine del

2011, il 7% degli allevamenti intensivi controllati nell'ambito del Piano Nazionale di Controllo, risultava essere ancora sieropositivo ed anche nei cinghiali abbattuti nelle stagioni di caccia 2009-2011, il 37% degli animali abbattuti è risultato sieropositivo (Costarelli, 2012).

Più incoraggiante il risultato relativo alla vaccinazione visto che il 43% degli allevamenti outdoor risulta vaccinato; tuttavia la copertura non copre in nessun caso il 100% degli animali sottoposti a prelievo. A distanza di quindici anni dall'applicazione del Piano di Controllo della malattia, la vaccinazione per PRV non viene ancora concepita come l'unica, vera, arma vincente per il raggiungimento dell'indennità ed è una pratica non sempre adottata nelle modalità e tempi adeguati. E' per questa ragione che la Malattia di Aujeszky in Umbria rappresenta ancora un problema sia nella popolazione selvatica che in quella dei suini allevati, indoor ed outdoor.

Ampiamente diffuse anche le sieropositività per **Toxoplasma**, PRRS e Circovirus. La toxoplasmosi risulta anche più diffusa di quanto lo sia nei cinghiali (Battistacci et al., 2006) probabilmente per una maggiore e costante vicinanza con popolazioni feline.

Le sieropositività alla **PRRS** e al **PCV2** possono essere motivate con l'acquisto di capi da allevamenti indoor. Si tratta infatti di patologie estremamente diffuse nell'allevamento intensivo. Tuttavia PRRSV e PCV2 sono ampiamente diffusi anche nei suidi selvatici dove raramente danno origine a quadri morbosi clinicamente evidenti. Inoltre i vettori passivi coinvolti nella diffusione di PRRSV sono numerosi, includendo insetti ed uccelli. Di recente sono stati soprattutto questi ultimi (anatre e gabbiani, in particolare) ad essere considerati come vettori importanti di PCV2 negli allevamenti all'aperto. Pertanto chiarire se la presenza di questi patogeni in suini allevati all'aperto sia di origine selvatica, o da allevamento indoor o "*autoctona*", non è possibile sulla base del semplice dato sierologico.

I risultati relativi all'accertamento per **Chlamydia spp.** hanno dimostrato valori di sieropositività limitati (4%). Si ritiene che le infezioni da chlamydia interessino prevalentemente allevamenti di suini domestici, intensivi o all'aperto, da cui l'infezione si diffonderebbe ai suidi selvatici (Di Francesco et al, 2011). Questi svolgerebbero un ruolo di reservoir e, chiudendo il cerchio, di potenziale fonte di infezione per il suino domestico. Purtroppo non abbiamo alcun tipo di informazione relativamente alle siero prevalenze di chlamydia spp. nelle popolazioni di cinghiali e suini allevati intensivamente dei nostri territori. La letteratura riporta dati contrastanti con ampie oscillazioni che vanno dallo 0% (Giovannini et al., 1988) al 63,6% (Di Francesco et al., 2011) dei cinghiali esaminati in diverse regioni d'Italia. Indubbiamente tali differenze sono attribuibili non solo alla situazione epidemiologica locale ma anche all'uso di metodiche diverse, più o meno sensibili. In ogni caso, considerata la potenzialità zoonosica dell'infezione, e la mancanza di dati regionali, riteniamo che la diffusione delle infezioni sostenute da Chlamydia nelle popolazioni di suidi domestici e/o selvatici della nostra regione, costituisca un argomento degno di ulteriori approfondimenti.

In 3 delle 23 aziende saggiate (13%) si sono evidenziati anticorpi nei confronti del **Virus influenzale H1N1**. Sappiamo che i suini giocano un ruolo importante nell'ecologia dell'influenza funzionando come "mixing vessels" con la potenzialità di generare nuovi ceppi patogeni per riassortimento genetico. L'allevamento all'aperto rappresenta indubbiamente un notevole rischio per la diffusione del virus influenzale dati i considerevoli livelli di esposizione alle numerose fonti di infezione.

CONCLUSIONI

Volendo interpretare i dati da noi ottenuti alla luce delle conoscenze sullo stato sanitario dei cinghiali e dei suini domestici, possiamo dire che questi risultati, nella limitatezza dei numeri considerati, fanno ipotizzare una situazione sanitaria degli allevamenti outdoor che rispecchia piuttosto fedelmente quella delle popolazioni di cinghiale e di molti degli allevamenti intensivi che insistono nel nostro territorio. Sulla base delle informazioni desunte dalle schede informative

ci sembra che l'investimento in termini di applicazione delle misure di biosicurezza e di pianificazione manageriale offra ancora ampi margini di miglioramento. La notevole consistenza dei cinghiali del territorio regionale, la presenza di cucciolate miste, la semplicità delle strutture di confinamento utilizzate, dimostrano l'esistenza di situazioni di rischio che potrebbero essere rimosse con semplici ed economici accorgimenti. L'utilizzo di recinzioni più adeguate, l'uso di reti provviste di dispositivo elettrico, l'isolamento delle scrofe in calore, una particolare attenzione agli aborti o alle situazioni di infertilità, possono essere le prime misure adottabili ed efficaci nel ridurre il rischio di trasmissione delle infezioni.

BIBLIOGRAFIA

Battistacci L., Moscati L., Sensi M., De Mia G.M., Urbani F., Costarelli S.) (2006) "Indagine sierologica su cinghiali d'allevamento e cinghiali abbattuti in sede venatoria, nella provincia di Perugia"- Atti VIII Congresso Nazionale SIDiLV 2006, pg. 217.

Battistacci L., Convito L., Croce M., Costarelli S., Mangili P., mariotti C., Sensi M., Moscati L. (2008) " Health status of the Eastern Cottontail (*Sylvilagus floridanus*) in the province of Perugia: results of a serological survey". Atti VII Conference of the EWDA (European Wildlife Disease Association), pg. 44.

Bergagna S., Zoppi S., Ferroglio E., Gobetto M., Dondo A., Elisabetta Di Giannatale E., Gennero M.S., Grattarola C. (2009); "Epidemiologic Survey for Brucella suis Biovar 2 in a Wild Boar (*Sus scrofa*) Population in Northwest Italy"; *Journal of Wildlife Diseases*, 45 (4), 2009, pp. 1178-1181.

Costarelli S. (2012) - "Stato sanitario degli ungulati selvatici in Umbria – risultati di un progetto di ricerca sulla presenza e diffusione di alcune malattie infettive dei cervidi e dei cinghiali nel triennio 2009-2012" Editing: Unità Operativa Editoria Biblioteca IZS UM, Perugia. Tipografia Chiamigraf. (ISBN: 978-88-97069-01-0).

Di Francesco A., Donati M., Morandi F., Renzi M., Masia M.A., Ostanello F., Salvatore D., Cevenini R., Baldelli R (2011); "Seroepidemiologic Survey for Chlamydia suis in Wild Boar (*Sus scrofa*) populations in Italy". *Journal of Wildlife Diseases*, 47 (3), pp. 709–712

Dondo A., Grattarola C., Gennero S., Zoppi S., Di Giannatale E.(2003) "Osservazioni preliminari sulla presenza di Brucella suis biovar 1 nel cinghiale in Piemonte"; *Il Progresso Veterinario Anno LVIII*, n° 3.

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., Dondo A. (2006). "Trend of Brucella suis infection in wild boar in Piedmont region (2002–2005)". *Epidemiologie et Sante' Animale* 49: 59–62.

Giovannini A., Cancellotii F.M., Turille C., Randi E. (1988) "Serological investigations for some bacterial and viral pathogens in fallow deer (*Cervus dama*) and wild boars (*Sus scrofa*) of the San Rossore preserve, Tuscany, Italy". *Journal of Wildlife Diseases*, 24: 127-132.

VALUTAZIONE DI UN TEST DI PCR REAL-TIME PER LA DIAGNOSI DELLE ENTERITI BATTERICHE DEL MAGRONAGGIO ED INGRASSO

EVALUATION OF A PCR REAL-TIME TEST FOR THE DIAGNOSIS OF BACTERIAL ENTERITIS IN GROWERS AND FATTENERS

SEBASTIANI C.; CUCCO, L.; CIULLO M.; MARESCA, C.; SCOCCIA, E.;
TARTAGLIA M.; MAGISTRALI C.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Parole chiave: real time PCR, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, concordanza, specificità, sensibilità

Key words: real time PCR, *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli*, *Lawsonia intracellularis*, agreement, specificity, sensitivity

Riassunto: le infezioni da *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* sono causa rispettivamente della dissenteria suina, spirochetosi intestinale suina e enteropatia proliferativa, malattie tipiche del periodo del magronaggio e ingrasso. Scopo di questo lavoro è stato valutare un protocollo di real-time PCR per il rilievo di *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* in feci suine da focolai di enterite. Dopo una valutazione della sensibilità analitica, il test di PCR real time è stato confrontato con l'esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* e con una nested PCR per *L. intracellularis*. L'esame colturale per *Brachyspira* e la nested PCR per *L. intracellularis* sono stati usati come gold standard per il kappa test di Cohen. Si è osservata una concordanza ottima sia per *B. hyodysenteriae* che *L. intracellularis*, e discreta per *B. pilosicoli*. I valori di sensibilità si sono collocati a 98% e 100%, quelli di specificità all'86% e 96% rispettivamente per *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*. Il likelihood ratio positivo è risultato pari a 6,85 per *B. hyodysenteriae* e 25,75 per *L. intracellularis*. Non è stato possibile valutare le stesse caratteristiche per *B. pilosicoli*, a causa del basso numero di campioni positivi riscontrato. Per *B. hyodysenteriae*, il numero medio di copie di DNA rilevato nei campioni positivi all'esame colturale è stato significativamente più elevato rispetto al numero medio riscontrato nei campioni negativi all'esame colturale. Questi risultati suggeriscono l'impiego del protocollo di PCR real time nella diagnosi dell'enteropatia proliferativa, e nei casi di enterite dove si sospetti la presenza di infezioni miste.

Abstract: *Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* are the causative agents of swine dysentery, porcine spirochetosis and proliferative enteropathy, diseases that are particularly common in growers and fatteners. The aim of this study was to evaluate a PCR real time test for the detection of *B. pilosicoli*, *B. hyodysenteriae* and *Lawsonia intracellularis* in pig feces from cases of enteritis. This PCR real time test, after an assessment of analytical sensitivity, was put in comparison with bacteriological test for *B. hyodysenteriae* and *B. pilosicoli*, and with a nested PCR test for *L. intracellularis*. Culture for *Brachyspira* spp. and nested PCR for detection of *L. intracellularis* were used as gold standard for Cohen's kappa test. An almost perfect agreement was observed for both *B. hyodysenteriae* and *L. intracellularis*, while a moderate agreement was described for *B. pilosicoli*. Sensitivity was 98% and 100%, and specificity 86% and 96% for *B. hyodysenteriae* and *L. intracellularis*,

respectively. The positive likelihood ratio was 6,85 for *B. hyodysenteriae* and 25,75 for *L. intracellularis*. These characteristics could not have been evaluated for *B. pilosicoli*, due to the limited number of positive samples recorded. For *B. hyodysenteriae* the average number of DNA copies in culture-positive samples was significantly higher compared to the average number recorded in culture-negative samples. Taken together, these data strongly suggest the use of the PCR real time test for the diagnosis of proliferative enteropathy, and in cases of enteritis where the presence of multiplex pathogens is suspected.

INTRODUZIONE

le infezioni da *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* sono causa rispettivamente della dissenteria suina, spirochetosi intestinale suina e enteropatia proliferativa, malattie tipiche del periodo del magronaggio e ingrasso del suino (Taylor, 1971; Trott, 1996; Gebhart, 2010). La dissenteria suina (DS), causata da *B. hyodysenteriae*, si caratterizza clinicamente per la sua particolare gravità, con episodi spesso ricorrenti, legati ad ingenti danni economici; tradizionalmente, il controllo della patologia si è basato sull'impiego di antimicrobici, ma il bando di alcune molecole nella seconda metà degli anni '90 prima, e successivamente, la diffusione di ceppi multi resistenti, hanno ostacolato il controllo della malattia (Karlsson, 2004). Attualmente l'infezione da *B. hyodysenteriae* è considerata una patologia emergente, sia in alcuni paesi europei, che negli Stati Uniti (Chander, 2012). Nelle forme croniche di malattia, la distinzione su base clinica della infezione da *B. hyodysenteriae* rispetto a quella da *L. intracellularis* o, più raramente, da *B. pilosicoli*, non è sempre immediata; e d'altra parte, l'iter diagnostico tradizionale prevede tempi piuttosto lunghi, ed è caratterizzato da una sensibilità contenuta (Willems, 2010). Inoltre, l'infezione da *B. hyodysenteriae* è spesso rilevata in concomitanza a quella di altri agenti di enterite, come *Salmonella typhimurium*, *Lawsonia intracellularis* o, meno frequentemente *B. pilosicoli*. Il riscontro di più di un agente nel corso di un singolo caso di enterite può rendere difficile l'interpretazione del dato diagnostico e a volte ostacolare il ricorso a terapie mirate (Reiner, 2011). Per questa ragione, negli ultimi dieci anni sono stati proposti protocolli diagnostici alternativi per la diagnosi eziologica di enterite: il ricorso a tecniche di PCR eseguite direttamente sul materiale fecale ha subito posto problemi in termini di sensibilità e specificità (Catanossi, 2008). Più recentemente, sono stati descritti metodi basati sull'impiego di tecnologie in real time (Willems, 2010, Akase, 2008; Song, 2009). Tali metodi offrono alcuni vantaggi rispetto alla PCR tradizionale, tra cui il minore rischio di contaminazioni crociate e la possibilità di quantificare il DNA batterico nel campione.

Scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare le caratteristiche di un protocollo in PCR real time (PCR-rt) descritto in letteratura, diretto a *L. intracellularis*, *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, su campioni provenienti da enteriti del magronaggio ed ingrasso, in parallelo con i test diagnostici tradizionali.

MATERIALI E METODI

Campionamento: le feci da analizzare sono state prelevate da 121 animali, provenienti da 31 allevamenti nel corso di focolai di enterite in suini nella fase di magronaggio/ingrasso, verificatesi nel periodo settembre 2011- novembre 2012. I campioni sono stati analizzati in parallelo con le seguenti metodiche: esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, PCR convenzionale per *L. intracellularis* e protocollo di PCR real-time multiplex oggetto di studio.

Esame colturale per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*: è stata effettuata una semina del materiale fecale in TSA-BJ medium, seguita da incubazione a $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per almeno 5

giorni. Al termine del periodo di incubazione, è stata annotata la presenza di una eventuale emolisi. In caso di assenza di emolisi, l'esame è stato chiuso come negativo. In caso di presenza di emolisi, è stata effettuata una colorazione di Gram o con Blu Vittoria dell'area di crescita corrispondente all'emolisi, e il vetrino osservato in microscopia ottica, per il rilievo di microrganismi dalla morfologia tipica di *Brachyspira* spp. Le colonie provenienti dalle piastre positive sono state quindi sottoposte ad estrazione del DNA mediante bollitura, seguita da PCR end-point secondo il protocollo descritto da La, et al. (2006) modificando la quantità finale di Taq, specifico per le due sole specie *B. pilosicoli* e *B. hyodysenteriae*. In breve le colonie estratte mediante bollitura sono stati amplificate in un volume di reazione di 25 µl, utilizzando come concentrazione finale dNTPs 100 µM, primers *B. hyodysenteriae* 0,16 µM, primers *B. pilosicoli* 0,2 µM, 1,25 U di GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega) con il seguente profilo di amplificazione: denaturazione iniziale a 94°C 1 min, 35 cicli a 94°C 30 sec, 58°C 90 sec e 68°C 2 min, estensione finale a 68°C 10 min, In caso di negatività, l'esame è stato chiuso come negativo.

PCR convenzionale per Lawsonia intracellularis: Il DNA è stato estratto dai campioni fecali, utilizzando il kit QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) a partire da 200 mg di feci. I DNA estratti sono stati sottoposti a PCR end-point secondo il protocollo descritto da Jones et al (1993). In breve, gli estratti sono stati amplificati tramite PCR nested: in ogni step la reazione è stata condotta in un volume di 25 µl utilizzando come concentrazione finale dNTPs 250 µM, primer LawA/LawB e LawC/LawD, 0,1 µM, 1,25 U di GoTaqFlexi DNA polymerase (Promega). I profili di amplificazione utilizzati sono stati: 1° step, denaturazione iniziale a 95°C 2min, 35 cicli a 95°C 20 sec, 55°C 20 sec e 72°C 30 sec, estensione finale a 72°C 10 min; 2° step, denaturazione iniziale a 95°C 2 min, 35 cicli a 93°C 30 sec, 55°C 20 sec e 72°C 30 sec, estensione finale a 72°C 3 min. I prodotti di amplificazione sono stati separati tramite elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in tampone TBE.

Messa a punto del test in PCR real-time: campioni di feci negativi per i tre patogeni oggetto del presente lavoro, sono stati contaminati con differenti quantità note di *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis*. Per le due specie di *Brachyspira* gli isolati sono stati quantizzati utilizzando lo standard 0,5 McFarland corrispondente a $1,5 \times 10^8$ UFC/ml; 200mg di feci sono stati contaminati con quantità note di cellule batteriche da 2×10^7 UFC a 2×10^3 UFC. Per *Lawsonia intracellularis* è stato utilizzato un vaccino (Enterisollleitis, Bohringer Ingelheim), risospeso in 10 ml di acqua in modo da ottenere circa 1×10^5 TCID₅₀/0,2 ml (TCID₅₀=Tissue Culture infectious dose); 200 mg di feci sono stati contaminati con $0,5 \times 10^5$, 1×10^5 e 2×10^5 TCID₅₀. Il DNA è stato estratto dal vaccino con il kit QIAamp DNA mini kit da 200 µl di campione.

PCR Real-time multiplex: i DNA estratti dalle colture batteriche, dal vaccino di *L. intracellularis* e dai campioni fecali contaminati con *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *Lawsonia intracellularis* sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems H., et al (2010), al fine di validare il protocollo. I primers e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* e del gene *aspA* per *L. intracellularis*. La reazione, condotta in un volume finale di 25µl, era costituita da 12,5µl di Quantitect Multiplex Mastermix (Qiagen), primers e sonde (0,18-0,3 µM) e 2,5µl di DNA target. Per l'analisi quantitativa, gli standard per le curve di taratura sono stati ottenuti, per ciascun patogeno, attraverso l'amplificazione delle regioni genomiche target della PCR-rt; gli amplificati sono stati poi purificati con il kit QIAquick PCR purification kit (Qiagen), quantizzati spettrofotometricamente ed è stato successivamente calcolato il numero di copie di DNA corrispondente. Per ognuno dei tre patogeni in esame le curve di taratura erano costituite da diluizioni scalari in base 10 (da 1×10^6 a 1×10^2 copie di DNA). Le reazioni

sono state eseguite utilizzando piattaforma 7900 HT SequenceDetection System (Life Technologies).

Elaborazione statistica: per quanto riguarda gli accertamenti per *Brachyspira hyodysenteriae* e *B. pilosicoli*, è stata valutata la concordanza tra l'esame batteriologico, assunto come gold standard e la PCR Real-time, per *Lawsonia intracellularis*, la concordanza è stata effettuata tra PCR tradizionale, assunta come gold standard, e la PCR Real-time. Il test utilizzato è il test K di Cohen valutato secondo la scala di Altman. Per le prove di PCR real-time per *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis* sono state inoltre calcolate la specificità e la sensibilità e l'indice di Youden, che fornisce una valutazione aggregata di sensibilità e specificità. Sulle stesse basi, e' stato definito il likelihood ratio positivo (LH+) e negativo (LH-) ed attraverso il LH+ è stata calcolata la probabilità post test, cioè la probabilità di trovare un maggior numero di campioni positivi con la PCR real Time rispetto al solo esame colturale (Thrusfield, 2005) Per quanto riguarda i dati quantitativi, sempre riferiti a *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, è stato valutato il numero di copie rilevate con la PCR real time rispetto al risultato ottenuto con l'esame batteriologico. L'ipotesi saggiata è che il numero di copie riscontrate con PCR real time con esame batteriologico positivo sia maggiore del numero di copie riscontrate quando l'esame batteriologico è risultato negativo. Dall'elaborazione sono stati esclusi i campioni che risultavano non quantizzabili (due, entrambi per *L. intracellularis*). La differenza è stata valutata con il t di Student utilizzando l'approssimazione di Welch.

RISULTATI

PCR real-time: efficienza e sensibilità analitica L'efficienza della PCR Real-time multiplex è stata calcolata mediante l'utilizzo di diluizioni seriali in base 10 (da 10^2 a 10^6 copie di DNA). Le pendenze delle curve di taratura sono risultate pari a -3,42 (*B. hyodysenteriae*), -3,48 (*B. pilosicoli*) e -3,49 (*L. intracellularis*) che corrispondono ad efficienze del 96%, 93,7% e 93,4%, rispettivamente. I limiti di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) sono stati calcolati analizzando varie diluizioni di DNA estratto da campioni di feci contaminate con quantità note dei tre patogeni. Ogni diluizione è stata analizzata in 10 replicati. In questo caso il LOD corrisponde alla minima concentrazione di analita a livello della quale si ottiene segnale nel 100% dei replicati. Il LOQ corrisponde alla diluizione in corrispondenza della quale il valore di RSD (Deviazione Standard Relativa) risulta minore o uguale a 25. I valori di LOD e LOQ ottenuti per *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e *L. intracellularis* espressi sia come numero di copie di DNA sia come UFC (o TCID₅₀ per *L. intracellularis*). sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Tabella 1: sensibilità analitica della PCR real-time. Sono indicati il LOD e il LOQ espressi come numero di copie di DNA/g feci

Table 1: analytic sensitivity of the PCR real-time test. LOD and LOQ are expressed as number of DNA copies/g of feces

	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>	<i>L. intracellularis</i>
LOD (copie)	7	172	28
LOQ (copie)	7	344	225
LOD (copie/gr feci)	$2,8 \times 10^3$	$6,9 \times 10^4$	$11,2 \times 10^3$
LOQ (copie/gr feci)	$2,8 \times 10^3$	$1,4 \times 10^5$	9×10^4

Tabella 2: sensibilità analitica della PCR real-time. Sono indicati il LOD e il LOQ espressi come UFC/g feci (*Brachyspira*) e come TCID₅₀/g feci (*L. intracellularis*)

Table 2: analytic sensitivity of the PCR real-time test. LOD and LOQ are expressed as number of UFC/g of feces (*Brachyspira*), and TCID₅₀/g of feces (*L. intracellularis*)

	<i>B. hyodysenteriae</i>	<i>B. pilosicoli</i>		<i>L. intracellularis</i>
LOD (UFC)	31,25	45	LOD (TCID ₅₀)	0.31x10 ⁻¹
LOQ (UFC)	31,25	90	LOQ (TCID ₅₀)	0.125
LOD (UFC /gr feci)	1,25X10 ⁴	1,8X10 ⁴	LOD (TCID ₅₀ /gr feci)	12.4
LOQ (UFC/gr feci)	1,25X10 ⁴	3,6X10 ⁴	LOQ (TCID ₅₀ /gr feci)	50

L'efficienza della procedura d'estrazione è stata calcolata per valutare l'effetto matrice (feci), comparando la sensibilità ottenuta per i campioni fecali contaminati con i batteri o con il vaccino in confronto con i batteri o il vaccino puri, estratti senza feci. Le perdite dovute all'effetto matrice, valutate confrontando i risultati ottenuti in PCR real-time dai DNA estratti dalle feci contaminate e dai batteri/vaccino senza feci, sono risultate inferiori a un ordine di grandezza per ciascuno dei tre patogeni oggetto di studio, in accordo con la letteratura.

E' stata dimostrata l'assenza di inibitori nel DNA estratto dalle feci contaminate attraverso l'analisi in PCR real-time del DNA tal quale e di una sua diluizione 1:4, le cui curve di amplificazione avevano unDCt=2 come atteso.

I risultati relativi agli accertamenti per *B. hyodysenteriae* in PCR real time e con colturale tradizionale sono espressi in tabella 3, mentre quelli relativi a *B. pilosicoli* sono descritti in tabella 4. In tabella 5 sono infine indicati gli esiti dei test per *L. intracellularis*, in PCR tradizionale e in real time PCR.

Tabella 3: risultati degli accertamenti per *B. hyodysenteriae* con metodo colturale e PCR real-time

Table 3: Detection of *B. hyodysenteriae* in pig fecal samples by culture and by PCR real time

PCR real-time	Esame colturale		Totale
	Negativi	Positivi	
Negativi	60	1	61
Positivi	10	46	56
Totale	70	47	117

Tabella 4: risultati degli accertamenti per *B. pilosicoli* con metodo culturale e PCR real-time*Table 4: Detection of B. pilosicoli in pig fecal samples by culture and by PCR real time*

PCR real-time	Esame culturale		Totale
	Negativi	Positivi	
Negativi	114	1	115
Positivi	1	1	2
Totale	115	2	117

Tabella 5: risultati degli accertamenti per *Lawsonia intracellularis* con PCR e PCR real time*Table 5: Detection of L. intracellularis in pig fecal samples by PCR and by PCR real time*

PCR real time	PCRLAW		Totale
	Negativi	Positivi	
Negativi	99	0	99
Positivi	4	18	22
Totale	103	18	121

Per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, il grado di concordanza osservato delle due prove è pari al 91% (accordo casuale 50%). Inoltre il valore della statistica Kappa è pari a 0,81 (IC95%: 0,63-0,99), concordanza ottima secondo la scala di Altman. La sensibilità della real-time qualitativa per *B. hyodysenteriae* è pari al 98% (IC95%: 89%-100%), la specificità è dell'86% (IC95%: 75%-93%). L'indice di Youden è risultato pari a 0,84 (I.C.95% 0,74-0,93). Il likelihood ratio positivo (LH+) è di 6,85 e quello negativo (LH-) è di 0,02. La probabilità pre-test è del 40% (tramite esame batteriologico), applicando la PCR real time agli stessi campioni la probabilità di trovare campioni positivi passa all'82%. La media delle copie riscontrate con esame batteriologico negativo è di 4316 copie (DS: 15035) e la media delle copie riscontrate con esame batteriologico positivo è di 42883 (DS: 101478). La differenza tra le medie, è risultata statisticamente significativa ($p=0,0065$).

I dati relativi a *B. pilosicoli* indicano un grado di concordanza osservato delle due prove pari al 98%, quasi uguale all'accordo casuale, 97%, Il valore Kappa è pari a 0,49 (IC95%: 0,31-0,67), concordanza discreta secondo la scala di Altman. Il basso numero di campioni positivi riscontrati per questo patogeno nel campione di feci esaminato non hanno permesso di effettuare ulteriori elaborazioni.

Infine, per *Lawsonia intracellularis* il grado di accordo che ci si aspetterebbe se le due prove fossero fatte in maniera casuale è del 72%, ma il grado di concordanza osservato è molto più alto (97%). Inoltre il valore Kappa è pari a 0,88 (IC95%: 0,70-1), concordanza

ottima secondo la scala di Altman. La sensibilità e la specificità sono risultate pari rispettivamente al 100% e al 96% (IC95%: 90%-99%), l'indice di Youden pari al 0,96 (IC95%: 0,92-1). Il LR positivo è risultato pari a 25,75 e il LR negativo pari a 0. La probabilità pre-test è del 15% e risulta dell'82% nel post test. Per quanto riguarda l'elaborazione dei dati quantitativi, la media delle copie riscontrate con PCR negativo è di 50 copie (DS: 434) e la media delle copie riscontrate con PCR positivo è di 3503334 (DS: 6718553). La differenza tra le medie, è risultata statisticamente significativa ($p=0,0205$).

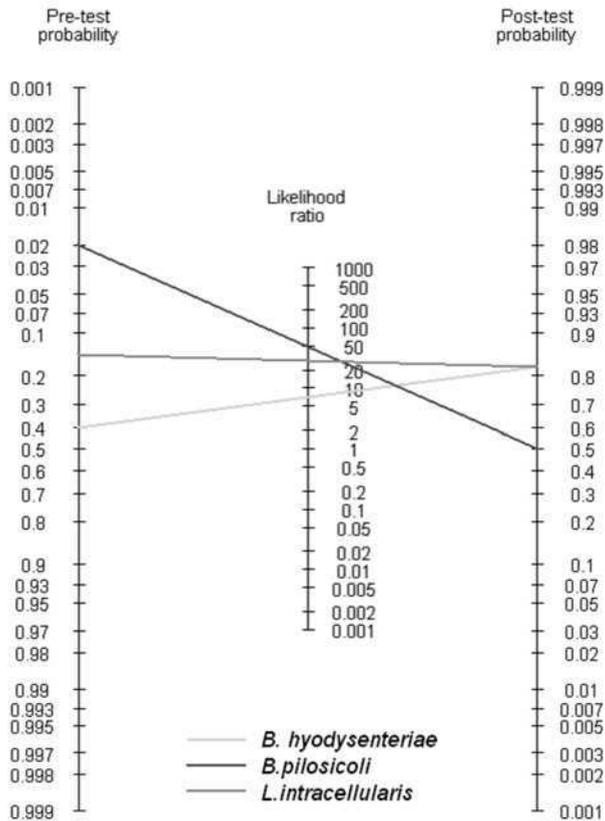


Fig. 1: probabilità pre-test e post-test
Fig. 1: pre-test and post- test probability

DISCUSSIONE

La determinazione dei parametri analitici di efficienza e sensibilità dei test in PCR real-time è un elemento importante per potere comparare protocolli pubblicati da differenti autori. Per quanto riguarda i dati di sensibilità analitica ottenuti nella fase di messa a punto della PCR real-time, essi sono risultati simili a quelli indicati da Willems (2010): ad esempio, il valore di LOQ indicato per *B. hyodysenteriae* si collocava a 8000 cellule/g di feci, molto vicino alle 10 000 cellule/g di feci stimate nel corso di questo lavoro. Una sensibilità inferiore, pari a circa

un logaritmo, si è invece osservata per *B. pilosicoli*. I dati di confronto tra il protocollo di PCR real-time e tecniche diagnostiche tradizionali applicati ai campioni di feci permettono di fornire indicazioni pratiche rispetto all'impiego di questa metodica. Innanzitutto, per quanto riguarda *B. hyodysenteriae*, il nuovo test presenta un grado di concordanza ottimo rispetto all'esame colturale; la sensibilità in particolare appare elevata (98%), consentendo un valore di likelihood ratio di 6.85 e in un'ultima analisi, un aumento moderato della sensibilità pre-test. Più contenuto, il valore riferito alla specificità (86%), legato alla presenza di campioni positivi in PCR real time risultati negativi all'esame batteriologico. L'indice di Youden, che consente una valutazione complessiva di sensibilità e specificità, è di 0,84 confermando le buone performance del protocollo in PCR real time.

Per quanto riguarda il riscontro di campioni negativi all'esame batteriologico e positivi in PCR real time, la maggior parte proveniva da focolai di enterite in cui *B. hyodysenteriae* era stata isolata da altri animali, mentre alcuni di essi era caratterizzato da un numero di copie basso. E' quindi possibile ipotizzare che per questi campioni il batteriologico abbia fornito un esito falsamente negativo. Questa ipotesi sembra essere confermata dal confronto del numero di copie di DNA rilevate nei campioni negativi all'esame colturale, rispetto a quelle riscontrate nei campioni positivi. Per quanto riguarda *B. pilosicoli*, il grado di concordanza tra le metodiche tradizionali e il protocollo in real time è solo discreto nella scala di Altman; tuttavia, il basso numero di campioni positivi per questo patogeno riscontrato nel corso di questo lavoro ostacola di fatto il confronto tra i test.

Infine, i dati riferiti a *L. intracellularis* descrivono valori di concordanza molto elevati, ottimi in base alla scala di Altman, con valori di sensibilità e specificità prossimi al 100% e indice di Youden di 0,96: forse a motivo della somiglianza tra i test, entrambi di tipo biomolecolare, effettuati direttamente sulle feci, e diretti allo stesso gene. Tuttavia, anche in questo caso, il protocollo di PCR real time permette di aumentare considerevolmente la probabilità pre-test.

Complessivamente, i dati riferiti al protocollo in PCR real time per i due patogeni *B. hyodysenteriae* e *L. intracellularis*, confrontati con le metodiche di tipo tradizionale, rivelano degli ottimi dati di concordanza e un aumento della possibilità pre-test, a differenza di quanto osservato in passato per protocolli in multiplex PCR (Catanossi, 2008). Il protocollo in real time presenta alcuni vantaggi nella routine diagnostica: è di esecuzione molto più rapida rispetto al colturale ed è meno soggetto a contaminazioni rispetto alla PCR convenzionale. Inoltre, rispetto all'esame batteriologico, il test si può applicare in campioni in stato di conservazione non ottimale. Il rilievo di più di un patogeno nella stessa reazione permette infine l'identificazione di infezioni miste, particolarmente frequenti nelle nostre realtà, a costi analitici contenuti.

CONCLUSIONI

Nel presente lavoro, il protocollo di PCR real time per *L. intracellularis* e *B. hyodysenteriae* ha dimostrato ottimi gradi di concordanza e performance diagnostiche pari o superiori rispetto ai test tradizionali: per *L. intracellularis* in particolare, potrebbe essere valutata una definitiva adozione della PCR real time. L'esame colturale per *Brachyspira* presenta tuttavia alcune caratteristiche che lo rendono ancora non sostituibile nella pratica diagnostica: in primo luogo, la possibilità di disporre del batterio isolato per la valutazione della resistenza agli antimicrobici ed in secondo luogo la capacità di individuare altre specie di *Brachyspira* potenzialmente patogene. Tuttavia, la PCR real time trova applicazione nei casi in cui sia necessaria una diagnosi rapida, o qualora, in allevamenti infetti, si necessiti di una conferma e infine negli studi epidemiologici. Inoltre, la possibilità di quantificare i batteri presenti all'interno del campione sta aprendo nuove strade nel campo della diagnosi delle enteriti. Infatti è stata dimostrata una correlazione tra la gravità dei sintomi e la quantità di *L. intracellularis* escrete nelle feci (Guedes, 2003) e tale associazione è stata supposta anche per *B. hyodysenteriae* (Reiner, 2011). Un test in grado di quantificare la carica

batterica fecale potrà quindi permettere di disporre di criteri interpretativi nel caso di infezioni miste e subcliniche e in ultima analisi, di adottare misure di controllo più mirate ed efficaci.

BIBLIOGRAFIA

- Akase S, Uchitami, Y.; Sohmura, Y., Tatsuta K.; Sadamasu, K.; Adachi Y. *Application of real time PCR for diagnosis of Swine Dysentery.* J Vet Med Sci. 2009 Mar;71(3):359-62.
- Catanossi, M.; Crotti, S.; Marenzoni M.L.; Sensi M.; Maresca C. Tentellini, M.; Valente, C.; Magistrali, C.F. (2008) *Concordanza tra diversi metodi per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio e ingrasso della specie suino.* Atti SIPAS 2008: 133-144.
- Chander, Y; Primus, A.; Oliveira A.; Gebhart C.J. (2012) *Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic Brachyspira species, provisionally designated "Brachyspira hamptonii".* J. Vet Diagn Invest. 2012 Sep;24(5):903-10.
- Gebhart CJ, Guedes RMC. In: Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals. 4. Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO, editor. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA; 2010. *Lawsonia intracellularis*; pp. 503–509.
- Guedes, R.M.; Winkelman, N.L.; Gebhart, C.J. (2003) *Relationship between the severity of porcine proliferative enteropathy and the infectious dose of Lawsonia intracellularis*, Vet Rec 153: 432-433.
- Karlsson M, Aspán A, Landén A, Franklin A. (2004) *Further characterization of porcine Brachyspira hyodysenteriae isolates with decreased susceptibility to tiamulin.* J Med Microbiol. 53:281-285.
- La, T. ; Collins, A.M.; Phillips, N.D.; Oksa, A. and D.J. Hampson (2006) *Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae, and Brachyspira pilosicoli in porcine faeces.* Letters in applied microbiology 42 (2006) 284-288.
- Jones G.F., Ward G.E., Murtaugh M.P., Lin G., Gebhart C.J. *Enhanced Detection of Intracellularis Organism of Swine Proliferative Enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in Feces by Polymerase Chain Reaction.* Journal of Clinical Microbiology, (1993) 31 :2611-2615.
- Reiner G, Hillen S, von Berg S, Kixmüller M, Willems H. (2011) *Analysis of bacterial load and prevalence of mixed infections with Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae and/or Brachyspira pilosicoli in German pigs with diarrhoea.* Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 124(5-6):236-41.
- Sheskin D.J. *Handbook of Parametric and Nonparametric Statistical Procedures.* Chapman and HAL/CRC ed. Fourth Edition, 2004.
- Song Y, Hampson, D.J. *Development of a multiplex qPCR for detection and quantitation of pathogenic intestinal spirochaetes in the faeces of pigs and chickens.* Vet Microbiol 2009 May 28;137(1-2):129-36.
- Taylor DJ, Alexander TJ (1971) *The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete.* Br Vet J. 1971 Nov;127(11):58-61.
- Trott D. J., Stanton T. B., Jensen N. S., Duhamel G. E., Johnson J. L., Hampson D. J. (1996) *Serpulina pilosicoli sp. nov., the agent of porcine intestinal spirochetosis.* Int. J. Syst. Bacteriol. 46:206–215.
- Thrusfield, M. *Veterinary Epidemiology.* Blackwell publishing. Third edition – 2005.
- Willems H, Reiner G. *A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of Brachyspira Hyodysenteriae, Brachyspira pilosicoli and Lawsonia intracellularis in pig faeces.* Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift (2010)123 (5-6): 205-209

SENSIBILITÀ DI CEPPI SPAGNOLI CLINICI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* AGLI ANTIBIOTICI

SENSITIVITY OF SPANISH CLINICAL ISOLATES OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE TO ANTIBIOTICS

ARGÜELLO H., CARVAJAL A., ALLER L.M., DIAZ J., RUBIO P.

*Dipartimento di Salute Animale, Unità di Malattie infettive ed Epidemiologia,
Facoltà di Medicina Veterinarie, Università di León, Spagna.*

Parole chiave: *Brachyospira hyodysenteriae*, sensibilità antimicrobica, dissenteria suina

Key words: *Brachyospira hyodysenteriae*, antimicrobial susceptibility, Swine dysentery

Riassunto

Questo studio valuta la sensibilità antibiotica di *Brachyospira hyodysenteriae*, l'agente eziologico della dissenteria suina (SD), a sei antibiotici (tilosina, tilvalosina, tiamulina, valnemulina, lincomicina e doxiciclina) disponibili in commercio per il trattamento dell'infezione. Sono stati testati mediante microdiluizione in brodo 60 ceppi di *Brachyospira hyodysenteriae*, prelevati nel corso del 2010 e 2011. Dai risultati ottenuti, per le pleuromutiline sono stati ottenuti valori di MICs simili a quelli di studi precedenti, e sono stati osservati un 20% e 40% di ceppi con sensibilità ridotta alla tiamulina ed alla valnemulina, rispettivamente. Tutti i ceppi erano resistenti alle massime concentrazioni testate per la tilosina, un antibiotico che in Spagna viene scartato per il trattamento della SD; diversamente, l'altro macrolide testato, la tilvalosina, presentava buoni risultati, in quanto tutti i ceppi sono risultati sensibili alle concentrazioni usate nel mangime. Infine, la sensibilità alla lincomicina è risultata simile a quella dei risultati precedentemente ottenuti in Spagna, e circa il 40% dei ceppi mostravano una sensibilità ridotta a questa lincosamide. Questo studio dimostra che l'analisi della sensibilità antibiotica riveste massima importanza ai fini della selezione dell'antibiotico, e della relativa concentrazione utilizzata per il controllo della dissenteria suina.

Abstract

The present study evaluates the antimicrobial susceptibility of *Brachyospira hyodysenteriae*, the etiological agent of swine dysentery (SD), to six antimicrobials (tylosin, tylvalosin, tiamulin, valnemulin, lincomycin and doxycycline) available for the treatment of the infection. 60 isolates of *B. hyodysenteriae* collected during 2010 and 2011 were tested by broth microdilution. By the results obtained, similar MICs values to previous studies were obtained for pleuromutilins with 20% and 40% of isolates with reduced susceptibility to tiamulin and valnemulin. All the isolates were resistant to the highest concentrations tested for tylosin, antimicrobial which is discarded in the SD treatment in Spain, while the other macrolide tested, the tylvalosin, yielded good results, being all the isolates susceptible to the concentrations used in feed. Finally susceptibility to lincomycin remained similar to previous results in Spain with almost 40% of the isolates with decreased susceptibility to this lincosamide. The study demonstrates that testing antimicrobial susceptibility is of paramount importance in the selection of the antimicrobial and the concentration used to control swine dysentery.

INTRODUZIONE

La Dissenteria dei suini (SD) è una grave colite muco-emorragica derivante dalla colonizzazione del grosso intestino dei suini a opera di *Brachyspira hyodysenteriae*, una spirocheta considerata il principale patogeno gastrointestinale della produzione suina (Hampson et al., 2006). Il controllo e il trattamento della SD prevedono l'utilizzo di antimicrobici, essendo la tiamulina, valnemulina, tilosina, tilvalosina e lincomicina i farmaci più comunemente usati a questo scopo nell'Unione europea (UE) (Hampson et al., 2006). Tuttavia, la comparsa di ceppi di *B. hyodysenteriae* con sensibilità ridotta ad uno o più di questi antibiotici è stata recentemente riportata in diversi paesi (Karlsson et al., 2001, Rohde et al., 2004) e complica il controllo di questa malattia.

La ricerca qui riportata, indica la sensibilità *in vitro* di ceppi di campo spagnoli di *B. hyodysenteriae* a vari farmaci comunemente usati per il trattamento e controllo della SD.

MATERIALI E METODI

Selezione ed isolamento dei ceppi batterici

Lo studio è stato effettuato a partire dalla valutazione di 60 ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* raccolti tra il 2010 e il 2011. I ceppi sono stati ottenuti dalla diagnosi routinaria di alterazioni gastrointestinali dei suini, effettuata dal nostro gruppo di ricerca presso la Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di León.

L'isolamento è stato effettuato nei casi sospetti di dissenteria a partire da campioni di feci, tramite la normale procedura di isolamento su terreni selettivi (Jenkinson e Wingar, 1981) ed identificazione dei ceppi emolitici con PCR (Rasback et al., 2006).

Determinazione della resistenza antibiotica

La sensibilità agli antibiotici di questi 60 ceppi di *B. hyodysenteriae* è stata determinata per mezzo di una tecnica di diluizione in terreno liquido su piastre a 96 pozzetti, sulla base del metodo descritto da Karlsson et al. (2003), che è il metodo più internazionalmente accettato per questa determinazione.

Sono state utilizzate diluizioni doppie in serie di ogni antibiotico secondo i seguenti intervalli di concentrazione: tiamulina (0,063-8 µg / ml), valnemulina (0,031-4 µg / ml), doxiciclina (0,125-16 µg / ml), tilvalosina (0,25-32 µg / ml), lincomicina (0,5-64) e tilosina (2-128 µg / ml). Le concentrazioni di antibiotici indicate corrispondono a quelle riconosciute a livello internazionale per la determinazione della sensibilità di *B. hyodysenteriae* agli antibiotici. In questo modo, è stata determinata la concentrazione minima inibente (MIC) di ciascun antibiotico per ogni ceppo. Allo stesso modo, sono stati ottenuti i valori di MIC che inibiscono la crescita del 90% e del 50% dei ceppi, dette CMIC90 e MIC50 rispettivamente.

RISULTATI

I risultati ottenuti per ognuno dei sei antibiotici testati sono illustrati nella figura 1:

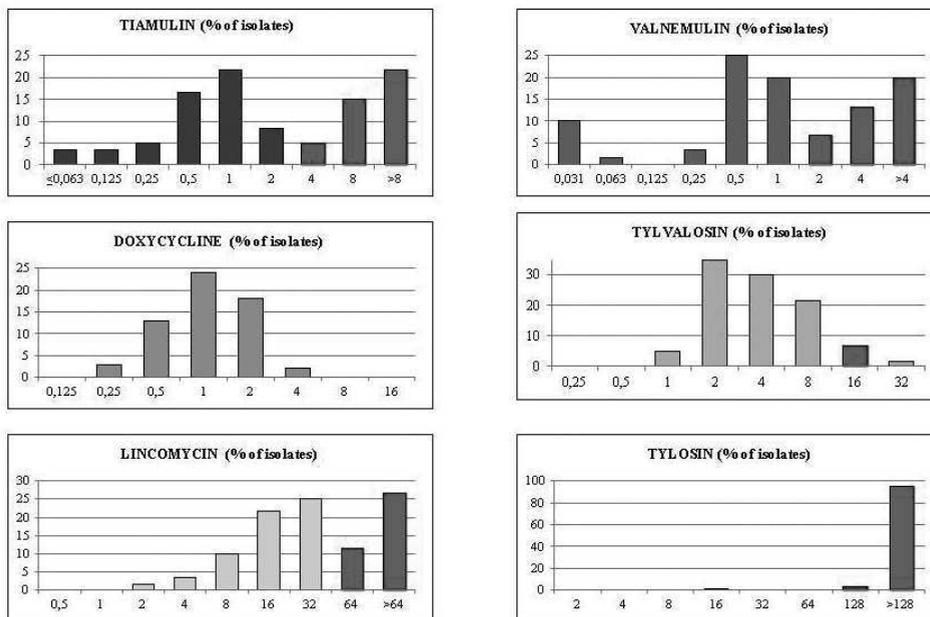


Figura 1. Distribuzione delle MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) di sei antimicrobici per 60 ceppi di campo spagnoli di *B. hyodysenteriae* raccolti nel corso del 2010 e del 2011. Le colonne rosse rappresentano le concentrazioni alle quali i ceppi sono considerati a ridotta sensibilità.

Figure 1. Distribution of MICs ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of six antimicrobials for 60 Spanish field isolates of *B. hyodysenteriae* recovered during 2010 and 2011. The red bars represent concentrations at which the strains are considered with reduced susceptibility.

La MIC₅₀ di un gruppo di ceppi batterici per un antibiotico è definita come la concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita del 50% dei ceppi che compongono il gruppo. Analogamente, la MIC₉₀ di un antibiotico per un gruppo di ceppi batterici è la concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita del 90% dei ceppi nel gruppo. La MIC₅₀ e la MIC₉₀ degli antibiotici testati nei confronti di questi 60 ceppi sono presentati nella Tabella 1:

	MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	MIC50	MIC90
Tiamulina	1	8
Valnemulina	1	4
Doxicilina	1	2
Tilvalosina	4	8
Lincomicina	16	64
Tilosina	>128	>128

Tabella 1. MIC50 e MIC90 per i sei antimicrobici selezionati nei 60 ceppi di *B. hyodysenteriae* inclusi nello studio.

Table 1. MIC50 and MIC90 for the six antimicrobials selected in the 60 *B. hyodysenteriae* isolates included in the study.

La tabella 2 mostra la percentuale di ceppi resistenti alle concentrazioni usate nei mangimi, che sono correlate alle concentrazioni che vengono raggiunte nel colon in base ai calcoli stabiliti da Burch et al. (Burch et al, 2005.):

Table 2 shows percentage of resistant isolates at the concentrations used in feed which are correlated with concentrations that these reach in the colon by the calculations established by Burch and colleagues (Borch et al., 2005):

	ppm nell'alimento <i>ppm in feed</i>	µg/g (ppm) nel colon µg/g (ppm) nel colon	N° di ceppi (%) con MIC>concentrazione nel colon <i>No of isolates (%) with MIC>concentration in colon</i>
Tiamulina	220	8	13 (21.6%)
Valnemulina	75	1.68	24 (40%)
Doxicilina	-	-	-
Tilvalosina	85	32	0 (0%)
Lincomicina	110	34.5	23 (38.3%)
Tilosina	200	100	60 (100%)

Tabella 2. Percentuale di ceppi resistenti ai sei antibiotici testate alle concentrazioni utilizzate nell'alimento e loro relativa efficacia calcolata nel colon.

Table 2. Percentage of isolates with resistant to the six antimicrobials tested at the concentrations used in feed and their calculated efficiency in colon

DISCUSSIONE:

La diminuzione della sensibilità agli antimicrobici di uso comune nel trattamento della dissenteria suina è stato riportato da precedenti studi spagnoli (Hidalgo et al., 2009; 2011), ed anche in studi simili effettuati in altri Paesi (Molnar, 1996. Karlsson et al., 2001, 2003; Lobova et al., 2004; Rohde et al., 2004). Dai risultati ottenuti in questi studi si deduce che la determinazione dei valori di MIC mediante prove antimicrobiche è di grande importanza per il successo del trattamento stabilito per il controllo della SD.

Nello studio sono stati inclusi quattro gruppi di antimicrobici (quelli disponibili per il trattamento della malattia). Le pleuromutiline, tiamulina e valnemulina, hanno dimostrato risultati MIC simili a quelli riportati da ceppi degli anni 2008 e 2009 (Hidalgo et al., 2011). La MIC₉₀ ha raggiunto 8 µg / ml per la tiamulina e 4 µg / ml per valnemulina, mentre la MIC₅₀ per entrambi i farmaci è stata di 1 µg/ml, con un incremento di almeno 4 volte rispetto alle MIC₅₀ dei ceppi di campo raccolti negli anni 2000-2007 (Hidalgo et al., 2009). Risultati simili sono stati riportati in Germania per 71 e 40 ceppi di campo di *B. hyodysenteriae* raccolti nel 2000 e nel 2001, rispettivamente (Rode et al., 2004). Tuttavia, molti dei ceppi di campo spagnoli presentavano MICs più elevate per la tiamulina e la valnemulina rispetto a quelle riportate da Rohde et al. (Rode et al., 2004), ed erano simili a quelle di ceppi tedeschi ed inglesi per i quali le MIC della tiamulina erano particolarmente elevate, come riportato da Karlsson et al. (2004).

Il 100% dei ceppi testati sono risultati resistenti alla concentrazione MIC raggiunta nel colon mediante l'uso di 200 ppm di tilosina, mostrando che la diminuita sensibilità dei ceppi spagnoli di *B. hyodysenteriae* a questo macrolide è diffusa. Sebbene la tilvalosina sia un derivato della tilosina, ha mostrato una distribuzione molto più sensibile rispetto a tilosina. La distribuzione dei ceppi nei confronti della tilvalosina era unimodale con un picco a 2 µg /ml. In accordo con i valori di breakpoint clinici suggeriti (Burch et al., 2005), la tilvalosina può essere utile nel trattamento della dissenteria suina in Spagna; nessuno dei ceppi testati ha presentato una diminuzione della sensibilità, mentre l'uso della tilosina non è chiaramente consigliabile. La distribuzione della lincomicina ha mostrato che la metà dei ceppi isolati erano vicino (sotto o sopra) al break point clinico selezionato ed un 25% dei ceppi sono inoltre cresciuti alla massima concentrazione testata (> 64mg/ml). I valori di MIC di questi antibiotici sono rimasti simili a quelli riportati da studi precedenti (Hidalgo et al., 2011) nonostante sino stati frequentemente usati per il controllo della SD. Le tetracicline (doxiciclina) possono essere usate in combinazione con le pleuromutiline per il controllo della SD ma le ricerche riguardo i break points o la sensibilità sono limitate rispetto ad altri antibiotici utilizzati in questo studio.

CONCLUSIONI

Il presente studio conferma le ricerche precedentemente effettuate sulla sensibilità antimicrobica di *B. hyodysenteriae*. L'analisi della sensibilità antibiotica è di massima importanza per determinare la scelta dell'antibiotico ma anche per limitare lo sviluppo di resistenza, modulando la concentrazione somministrata. È stato dimostrato un aumento della resistenza alle pleuromutiline, oltre ad una mancanza di efficacia della tilosina nei confronti della SD. Diversamente, la tilvalosina, un altro macrolide, risulta utile per il trattamento della SD, in quanto nessuno dei ceppi testati superava i limiti di sensibilità stabiliti. Nonostante l'uso comune delle lincosamidi nei trattamenti di campo, non vi è un aumento della resistenza a questo antibiotico, anche se, confrontandolo con ricerche eseguite in precedenza, molti ceppi sono oggi vicini alla concentrazione stimata per il breakpoint.

BIBLIOGRAFIA

Burch D.G. S. (2005). Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations. *Pig J.* 56:8–24.

Hampson D.J, Fellstrom, C., Thomson J.R. (2006). Swine dysentery B.E. Straw, J.J. Zimmerman, S. D'Allaire (Eds.) *et al.*, Diseases of Swine (ninth ed.), Blackwell Publishing Professional, Ames, IA, USA (2006), pp. 785–805.

Hidalgo A., Carvajal A., García-Feliz C., Osorio J., Rubio P. (2009) Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res Vet Sci.* 2009 Aug;87(1):7-12.

Hidalgo Á., Carvajal A., Vester B., Pringle M., Naharro G., Rubio P. (2011). Trends towards lower antimicrobial susceptibility and characterization of acquired resistance among clinical isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother.* 55:3330-3337.

Jenkinson S.R., Wingar C.R. (1981). Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet Rec.* 109(17):384-385.

Karlsson M., Gunnarsson A., Franklin A. (2001). Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anim Health Res Rev.* 2:59–65.

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

Karlsson M., Aspán A., Landén A., Franklin A. (2004). Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53:281–285.

Lobova D., Smola J., Cizek A. (2004). Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* *Journal of Medical Microbiology*, 53 (2004), pp. 287–291.

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

Råsbäck T., Fellström C., Gunnarsson A., Aspán A. (2006). Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J. Microbiol. Methods* 66:347–353

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

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX IN SUINI: INDAGINI PRELIMINARI IN PIEMONTE

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX IN SWINE: PRELIMINARY INVESTIGATIONS IN PIEDMONT REGION

FERRARO G.¹, ZOPPI S.¹, DONDO A.¹, TRON S.², BURZIO G.², GIACOMINO F.²,
GORIA M.¹

¹Istituto Zooprofilattico Profilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino;

²Servizio Veterinario ASL TO3, Area B

Parole chiave: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*, suini

Key words: *Mycobacterium avium* subspecies *avium*, *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*, swine

RIASSUNTO: L'infezione sostenuta da *M. avium* complex (MAC) nel suino è spesso un problema sottovalutato, che può ripercuotersi sulla produzione, causando consistenti perdite economiche.

Il presente lavoro si è posto come obiettivo, attraverso l'isolamento, l'identificazione e la caratterizzazione dei ceppi di *M. avium* a partire da campioni provenienti da un macello piemontese di suini nel periodo 2008-2012, di fornire un contributo alla comprensione sia dell'eziologia della tubercolosi da MAC nel suino sia del ruolo di questo animale come serbatoio e potenziale vettore di zoonosi nella realtà suinicola piemontese.

A partire da 94 campioni di linfonodi e organi di suini prelevati al macello, sono stati isolati 35 ceppi che, con il supporto di tecniche di biologia molecolare, sono stati identificati come *M. avium*: di questi 24 sono stati caratterizzati come *M. avium* subsp. *avium* e 11 come *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Il ricorso a tecniche di caratterizzazione biomolecolare dei ceppi rende più accurata la diagnosi di laboratorio al fine di valutare l'impatto delle infezioni da *M. avium* negli allevamenti suini in Piemonte per porre le basi per uno studio epidemiologico più approfondito.

ABSTRACT: In swine *M. avium complex* (MAC) infection can lead to severe economic losses for retention at slaughter and nevertheless this infection is often underestimated.

This work is aimed to make a preliminary evaluation of the impact of MAC infection in pig livestock in Piedmont, in order to sketch out, through the isolation, identification and characterization of *M. avium* strains isolated from 2008 to 2012, the pig role as a reservoir and potential zoonosis vector.

Ninety-four samples of lymph nodes and organs collected from pigs at slaughter were analysed. In total, 35 strains were isolated and identified as *M. avium* by mean of biomolecular techniques: 24 of them were characterized as *M. avium* subsp. *avium* and 11 as *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Biomolecular characterization techniques are important diagnostic tools that makes more accurate the laboratory diagnosis when the impact of infections by *M. avium* pig farms is assessing and, in the observed context, it could lay the foundations for further studies to better define aetiology and epidemiology of MAC infection in pigs in Piedmont region.

Nell'eziologia della tubercolosi nel suino rientrano frequentemente MAC e soprattutto negli ultimi anni in Europa è stato registrato un aumento di prevalenza di lesioni sostenute da *M. avium* nei suini regolarmente macellati (Domingos *et al.*, 2009).

L'infezione da MAC nell'allevamento suino è fortemente correlata ad un risvolto di tipo economico a causa delle perdite dovute allo scarto di organi o della carcassa *in toto* durante le fasi di macellazione (Matlova L. *et al.*, 2005; Alvarez J. *et al.*, 2011).

Di recente è stato attribuito un ruolo attivo di questi microrganismi come causa di aborto (Eisenberg *et al.*, 2012) e come agenti di potenziale zoonosi, in quanto è stata riconosciuta una loro correlazione con i ceppi isolati da forme morbose in pazienti umani immunocompromessi (Tirkkonen *et al.*, 2010; Falkinham J.O. III, 2009).

Il ciclo dell'infezione è in prevalenza di tipo oro-fecale: i soggetti infetti sono in grado di eliminare i batteri con le feci dopo 20 – 30 giorni dal contagio, mentre le lesioni linfonodali, localizzate in sede faringea, cervicale e mesenterica, compaiono tre o quattro mesi dopo l'infezione (Thorel *et al.*, 2001).

Generalmente l'infezione nel suino è caratterizzata dall'assenza di sintomi clinici specifici per cui l'unico supporto diagnostico valido è rappresentato dagli esami *post mortem*. Solitamente le lesioni rilevabili sono limitate ai linfonodi retrofaringei, cervicali e mesenterici: appaiono di aspetto variabile, di colore bianco - giallastro, con dimensioni che possono essere ridotte (Agdestein *et al.* 2012) fino ad includere l'intero linfonodo; possono manifestarsi una o più aree caseose con margini non completamente definiti, può essere presente fibrosi diffusa, mentre raramente si osservano calcificazione e formazione di una capsula.

La generalizzazione dell'infezione è poco frequente nei suini e si osserva principalmente in soggetti di 4 – 8 settimane di età: in tal caso si rilevano lesioni miliari disseminate in sede epatica con eventuale coinvolgimento di milza e polmone; in alcuni casi si osservano lesioni in sede renale (Thorel 1998; Varello *et al.*, 2012).

A livello polmonare sono possibili lesioni miliari, traslucide, di pochi millimetri come, nel caso di infezioni da *M. avium* sierotipo 2, lesioni di tipo caseoso simil-tubercolari.

Nell'ambito di *M. avium* complex (MAC) sono incluse due specie geneticamente distinte: *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (Legrand *et al.*, 2000) i quali non sono differenziabili sotto il profilo morfologico, colturale, biochimico e perciò sono riunite in un unico "complex", che comprende 28 sierotipi.

I sierotipi da 1 a 6, da 8 a 11 e 21 sono attribuiti a *M. avium* ed i sierotipi 7, da 12 a 20 e da 22 a 28 sono classificati come *M. intracellulare* (Pate *et al.*, 2005).

Grazie all'ausilio della biologia molecolare è stato possibile dimostrare la grande variabilità dei ceppi prima considerati sierotipi di *M. avium* e riclassificarli come sottospecie: *M. avium* subsp. *sylvaticum* (MAS), *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), *M. avium* subsp. *avium* (MAA) e *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH) (Pate *et al.*, 2009; Turenne *et al.*, 2007).

MAA agente causale della tubercolosi aviare, è un patogeno stretto dei volatili, 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).

I ceppi MAA isolati dai volatili sono attribuiti ai sierotipi 1, 2, 3 (Pate M. *et al.*, 2005).

MAH è un patogeno opportunisto con larga diffusione ambientale. Ha un ampio spettro d'ospite ed è frequentemente causa di infezione per i suini, portando ad una significativa perdita economica negli allevamenti (Radomski *et al.*, 2010; Matlova *et al.*, 2005) in quanto causa di aborti ed infezioni urogenitali (Eisenberg T. *et al.*, 2012; Wellenberg *et al.*, 2010).

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 (Pavlik *et al.*, 2008; Pate *et al.*, 2009). Nell'uomo le infezioni si verificano in persone HIV immunocompromesse, persone immunocompetenti con subalterne patologie polmonari, ed in bambini con fibrosi cistica (Shin *et al.*, 2010; Alvarez *et al.*, 2008; Field 2006; Henry *et al.*, 2004).

I sierotipi attribuiti a MAH sono: 4 -6, 8-11 e 21 (Pate *et al.* 2005).

La discriminazione delle sottospecie MAA e MAH è di fondamentale importanza per un'accurata diagnosi e per le indagini epidemiologiche.

Tale differenziazione si basa sull'identificazione differenziale, mediante metodiche di biologia molecolare, di elementi di inserzione specifici, quali *IS901* e *IS1245*, presenti nel genoma (Kunze *et al.* 1992; Guerrero *et al.*, 1995).

In MAA sono presenti entrambi gli elementi di inserzione (*IS1245* presente in singola copia, *IS901* presente da 2 a 17 copie). MAH non possiede l'elemento di inserzione *IS901*, ma al contrario *IS1245* è presente in numerose copie (7-27) (Slana *et al.*, 2010).

Questo studio è stato condotto per determinare la diffusione di MAC per quanto riguarda le due sottospecie di interesse, MAA e MAH, in suini regolarmente macellati fare valutazioni preliminari dal punto di vista della sanità pubblica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Il campionamento è stato eseguito presso un grande macello piemontese di suini nel periodo compreso tra il 2008 e il 2012.

A seguire la visita ispettiva ordinaria *post mortem*, sulle carcasse in cui erano presenti lesioni granulomatose riconducibili a micobatteriosi, veniva predisposto il prelievo dei campioni di linfonodi da sottoporre agli accertamenti di laboratorio. Nei casi in cui le lesioni erano generalizzate e pertanto presenti su altri organi oltre alla più comune localizzazione a carico dei linfonodi della testa, veniva predisposto un campionamento supplementare sugli organi sede di lesione.

Nel presente lavoro sono stati prelevati e analizzati complessivamente 94 linfonodi retrofaringei e sottomandibolari di suini regolarmente macellati e provenienti da 42 aziende dislocate sul territorio piemontese, come rappresentato in tabella n. 1.

I campioni venivano successivamente inviati refrigerati ai laboratori diagnostici dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta della Sede di Torino.

Esame anatomo-patologico

Gli organi prelevati in sede di macellazione sono stati sottoposti in laboratorio ad esame anatomo-patologico per valutare la presenza di lesioni tubercolari ed appurarne tipologia, estensione e localizzazione.

Esame culturale per Micobatteri

Porzioni degli organi e/o dei linfonodi, previa eliminazione di tessuto adiposo e connettivale, sono stati sminuzzati e omogeneizzati mediante Stomacher® (VWR-Pbi, Milano); l'omogenato è stato quindi suddiviso in due aliquote sottoposte rispettivamente a due differenti metodi di decontaminazione con NaOH 2% e HPC 1.5%. Dalle aliquote decontaminate e centrifugate a 3000 g per 20 minuti è stato recuperato il pellet. La semina del campione è avvenuta su una batteria di terreni selettivi, composta da Stonebrink, Lowenstein Jensen Medium, Lowenstein Jensen senza glicerina. I terreni inoculati sono stati incubati in termostato per un periodo di 10 giorni in atmosfera arricchita con 5% CO₂ a 37°C e per i

successivi 50 giorni a 37°C in aerofilia.

In presenza di colonie sospette a partire dalla seconda-terza settimana di incubazione, si è proceduto alla colorazione di Ziehl-Neelsen e in caso di positività, queste sono state sottoposte a identificazione per via molecolare.

Identificazione molecolare mediante Multiplex PCR

Il DNA delle colonie isolate è stato estratto mediante trattamento termico e poi sottoposto a Multiplex PCR, variazione “in house” del metodo descritto da Kulski *et al.* (1995) e da Sinclair *et al.* (1995), per l’identificazione molecolare differenziale di diverse specie di micobatteri (*Mycobacterium spp.*, *M. tb complex*, *M. tuberculosis* ed *M. avium*). La multiplex PCR utilizzata si basa sull’amplificazione simultanea di quattro differenti bersagli molecolari: il 16S rRNA, in una zona di 1030 paia di basi specifica per *Mycobacterium spp.*, l’elemento di inserzione IS986, in una porzione di 245 paia di basi caratteristica dei micobatteri appartenenti al *M. tb complex*, il gene mtp40, specifico per il *M. tuberculosis*, in una regione di 396 paia di basi, e una porzione di circa 180 paia di basi dell’rRNA 16S, distintiva per *M. avium*.

Caratterizzazione molecolare mediante amplificazione dell’elemento IS901 e IS1245

Le colonie identificate come *M. avium* sono state successivamente sottoposte ad analisi per la presenza della regione IS901 (143 paia di basi) e della regione IS1245 (472 paia di basi) al fine della differenziazione di sottospecie in *M. avium* subsp. *avium* e *M. avium* subsp. *hominissuis*.

Sono state così allestite due simplex PCR mediate rispettivamente dai primers IS901se (5’-GTGATCAAGCACCTTCGGAA-3’) e IS901pe (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 *et al.* (1995). I risultati dell’amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

RISULTATI

Tutti i campioni esaminati (n. 94) presentavano lesioni caseo-calcifiche a carico dei linfonodi della testa, ad eccezione di 24 casi in cui erano presenti principalmente lesioni caseose generalizzate a carico di polmoni, fegato e linfonodi associati (n=22) e a carico dei reni (n=2). In 35 casi si è ottenuto l’isolamento di colonie riconducibili a *Mycobacterium spp.*

L’identificazione molecolare dei ceppi isolati nel presente lavoro è riportata in tabella 2.

Provincia	Comune	ID AZIENDA	Campioni prelevati
TORINO	BALDISSERO TORINESE (TO)	6	2
	CAMBIANO (TO)	9	3
	FRASSINETO PO (TO)	15	1
	PINEROLO (TO)	42	2
	RIVA PRESSO CHIERI (TO)	36	1
	VIGONE (TO)	41	3
ASTI	VALFENERA (AT)	21	1
BIELLA	CERRIONE (BI)	5	2
NOVARA	NOVARA (NO)	20	1
	SAN PIETRO MOZZO (NO)	23	1
VERCELLI	BORGIO D'ALE (VC)	4	1
CUNEO	BARGE (CN)	1	1
		2	2
		3	5
	BUSCA (CN)	7	1
	CARAGLIO (CN)	8	4
	CAVALLERLEONE (CN)	10	2
	CENTALLO (CN)	11	1
		12	2
	CEVA (CN)	13	4
	CHERASCO (CN)	14	4
	FAULE (CN)	16	3
	FOSSANO (CN)	17	2
		18	1
		19	3
	MONDOVI' (CN)	22	1
	MOROZZO (CN)	24	2
	MURELLO (CN)	25	1
		26	3
	RACCONIGI (CN)	27	5
		28	4
		29	6
		30	2
	ROCCA DE' BALDI (CN)	31	3
	SALUZZO (CN)	32	2
		33	2
	SAVIGLIANO (CN)	34	3
		35	1
	SCALENGHE (CN)	40	1
	SCARNAFIGI (CN)	37	3
		38	1
VOTTIGNASCO (CN)	39	1	
Totali			94

TABELLA 1: Distribuzione dei campioni esaminati secondo provincia e comune di provenienza dell'allevamento

TABLE 1: Distribution of examined samples, grouped for site (province /town) and herds

Provincia	Comune	ID AZIENDA	Campioni prelevati	MAH	MAA	NEG
TORINO	BALDISSERO TORINESE (TO)	6	2			2
	CAMBIANO (TO)	9	3			3
	FRASSINETO PO (TO)	15	1			1
	PINEROLO (TO)	42	2			2
	RIVA PRESSO CHIERI (TO)	36	1	1		
	VIGONE (TO)	41	3	3		
ASTI	VALFENERA (AT)	21	1			1
BIELLA	CERRIONE (BI)	5	2	1		1
NOVARA	NOVARA (NO)	20	1			1
	SAN PIETRO MOSEZZO (NO)	23	1			1
VERCELLI	BORGIO D'ALE (VC)	4	1	1		
CUNEO	BARGE (CN)	1	1			1
		2	2			2
		3	5			5
	BUSCA (CN)	7	1	1		
	CARAGLIO (CN)	8	4			4
	CAVALLERLEONE (CN)	10	2			2
	CENTALLO (CN)	11	1			1
		12	2			2
	CEVA (CN)	13	4			4
	CHERASCO (CN)	14	4		3	1
	FAULE (CN)	16	3	3		
	FOSSANO (CN)	17	2			2
		18	1			1
		19	3			3
	MONDOVI' (CN)	22	1			1
	MOROZZO (CN)	24	2			2
	MURELLO (CN)	25	1		1	
		26	3			3
	RACCONIGI (CN)	27	5		4	1
		28	4		4	
		29	6		6	
		30	2		2	
	ROCCA DE' BALDI (CN)	31	3			3
	SALUZZO (CN)	32	2			2
		33	2			2
	SAVIGLIANO (CN)	34	3			3
		35	1	1		
	SCALENGHE (CN)	40	1			1
	SCARNAFIGI (CN)	37	3		3	
		38	1		1	
VOTTIGNASCO (CN)	39	1			1	
Totali			94	11	24	59

TABELLA 2: rappresentazione dei risultati di campionamento, isolamento e identificazione molecolare dei ceppi suddivisi per provincia, comune e allevamento di origine.

TABLE 2: representation of the results of sampling, isolation and molecular identification of strains grouped by site (province / town) and herd.

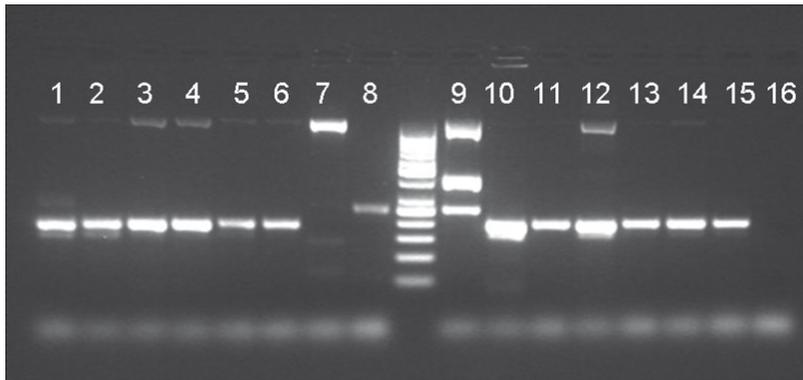


FIGURA 1: MULTIPLEX PCR. In posizione 1-6, 11-15: ceppi identificati come *M. avium*; in posizione 7-10 ceppi di riferimento (controlli positivi): in posizione 7 *M. spp*; in posizione 8 *M. Tb cx*, in posizione 9 *M. tuberculosis*, in posizione 10 *M. avium*. Marker di peso molecolare 50-1000 bp

FIGURE 1: MULTIPLEX PCR. Lane 1-6, 11-15: isolated strains identified as *M. avium*; lane 7-10 reference strains (Positive controls); lane 7 *M. spp*; lane 8 *M. Tb cx*, lane 9 *M. tuberculosis*, lane 10 *M. avium*. Molecular size marker 50-1000 bp.

I ceppi identificati come *M. avium* sono stati sottoposti ad ulteriori analisi mediante simplex PCR per la differenziazione delle sottospecie.

La caratterizzazione molecolare ha evidenziato la presenza di 24 ceppi *M. avium* subsp. *avium*, caratterizzati dalla presenza di entrambi gli elementi di inserzione *IS1245*, *IS901*; mentre 11 colonie sono state identificate come *M. avium* subsp. *hominissuis*, caratterizzate dall'assenza dell'elemento di inserzione *IS901* e dalla presenza della sequenza *IS1245*.

Nelle figure 2a-b viene rappresentato l'esito della simplex PCR per *IS901* e *IS1245* di alcuni dei ceppi isolati nel corso del presente studio.

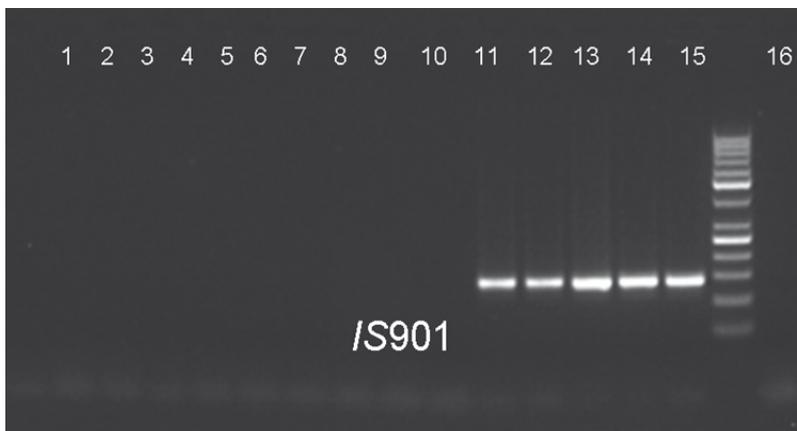


FIGURA 2A: SIMPLEX PCR IS901. In posizione 1-9, 12-15 ceppi isolati in esame per la caratterizzazione di sottospecie su base molecolare; in posizione 10 ceppo di riferimento

M. avium subsp *hominissuis* (Controllo positivo); in posizione 11 ceppo di riferimento *M. avium* subsp. *avium* (Controllo positivo); in posizione 16 controllo reagenti negativo (Acqua ultrapura sterile). Marker di peso molecolare 50-1000 bp.

FIGURE 2A: SIMPLEX PCR IS901. Lane 1-9, 12-15 isolated strains under investigation for molecular subspecies identification; lane 10 *M. avium* subsp *hominissuis* reference strain (Positive control); lane 11 *M. avium* subsp. *avium* reference strain (Positive control); lane 16 control reagents negative (sterile ultrapure water). Molecular size marker 50-1000 bp.

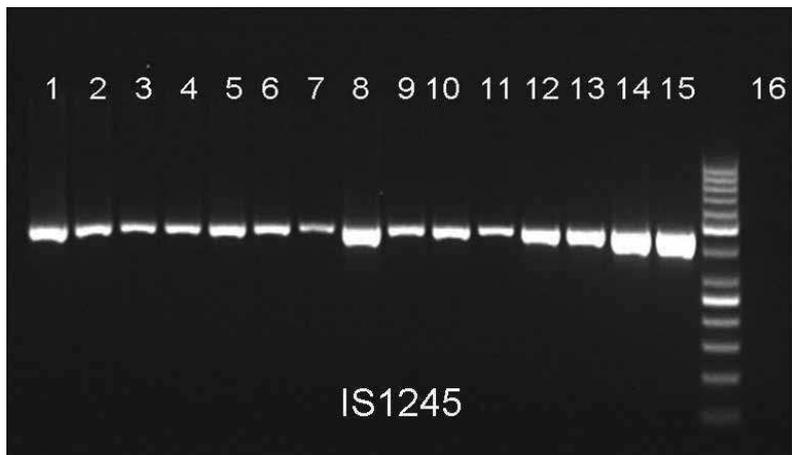


FIGURA 2B: SIMPLEX PCR IS1245: In posizione 1-9, 12-15 ceppi isolati in esame per la caratterizzazione di sottospecie su base molecolare; in posizione 10 ceppo di riferimento *M. avium* subsp *hominissuis* (Controllo positivo); in posizione 11 ceppo di riferimento *M. avium* subsp. *avium* (Controllo positivo); in posizione 16 controllo reagenti negativo (Acqua ultrapura sterile). Marker di peso molecolare 50-1000 bp. Sulla base del pattern di presenza dei due marcatori *IS901* e *IS1245* i ceppi rappresentati in foto 2a e 2b sono stati classificati come appartenenti a *M. avium* subsp. *homonissuis* (Posizione 1-9) e appartenenti a *M. avium* subsp. *avium* (Posizione 12-15).

FIGURE 2B: SIMPLEX PCR IS1245. Lane 1-9, 12-15 isolated strains under investigation for molecular subspecies identification; lane 10 reference strain *M. avium* subsp *hominissuis* (Positive control); lane 11 reference strain *M. avium* subsp. *avium* (Positive control); lane 16 control reagents negative (sterile ultrapure water). Molecular size marker 50-1000 bp. According to the pattern of presence of the two markers *IS901* and *IS1245*, the strains represented in pictures 2a and 2b have been classified respectively as belonging to *M. avium* subsp. *homonissuis* (Lane 1-9), *M. avium* subsp. *avium* (Lane 12-15).

DISCUSSIONE

Ad oggi la situazione degli allevamenti suini in Italia nei confronti dell'infezione da MAC non è del tutto nota.

Lo studio preliminare condotto sui ceppi di *M. avium* isolati negli allevamenti suini in Piemonte, permette di pianificare future indagini epidemiologiche, utili a ricostruire le dinamiche di diffusione dell'infezione da MAC negli allevamenti piemontesi, e finalizzata al monitoraggio di questa malattia spesso sottovalutata ma che può provocare perdite

economiche e limitazioni nel commercio con Paesi extraeuropei.

Le metodiche di biologia molecolare hanno consentito l'identificazione di ceppi di MAC isolati nel periodo 2008-2012.

Dall'analisi dei dati raccolti risulta evidente la diffusione dei ceppi appartenenti a MAC negli allevamenti suini del territorio piemontese correlate principalmente a lesioni confinate a livello dei linfonodi della testa. Questo rilievo è però da riferire, nella nostra casistica, principalmente a *M. avium* subsp. *hominissuis*.

A differenza di quanto osservato in altri studi (Pavlik *et al.*, 2005; Pate *et al.*, 2009), in particolare è emerso nella nostra realtà un cluster d'infezione da *M. avium* subsp. *avium*, caratterizzato da lesioni generalizzate e alta frequenza di scarti alla macellazione.

Questo lavoro evidenzia l'importanza nel ricorrere alle tecniche di biologia molecolare quale supporto alle tradizionali tecniche di isolamento e identificazione dell'agente eziologico MAC e per le successive indagini epidemiologiche che spesso permettono di individuare e monitorare in tempi estremamente ridotti la diffusione dei ceppi nei territori.

Le metodiche biomolecolari possono essere anche utilizzate con successo nello studio di episodi di trasmissione dell'agente infettivo tra animale e uomo e viceversa, eventi molto rari ma comunque possibili per la natura zoonotica dell'agente eziologico MAC, in particolare di MAH.

Per una più efficace applicazione in campo epidemiologico, potrebbe essere utile implementare il grado di differenziazione all'interno della stessa sottospecie affiancando alle tecniche descritte nel presente lavoro altre tecniche biomolecolari come l'analisi del polimorfismo VNTR.

CONCLUSIONI

L'infezione da micobatteri nell'allevamento suino è segnalato a livello internazionale (Thorel *et al.*, 2001).

Generalmente nei suini le infezioni sostenute da MAC causano patologie localizzate piuttosto che generalizzate, con lesioni ristrette principalmente ai linfonodi della testa, del collo e/o linfonodi mesenterici (Thorel *et al.*, 2001), tuttavia in alcuni casi sono stati segnalati gravi episodi di forme generalizzate (Zoppi *et al.*, 2012).

Dal momento che le carni provenienti da animali con infezioni generalizzate devono essere distrutte, l'infezione da MAC nel suino può causare grandi perdite economiche agli allevatori. Con il presente lavoro è stato possibile porre in evidenza in via preliminare la presenza di MAC negli allevamenti suini del territorio piemontese.

L'isolamento culturale dell'agente eziologico e la successiva caratterizzazione molecolare degli isolati possono agevolare l'iter diagnostico e nel contempo porre le basi per uno studio epidemiologico retrospettivo approfondito, utile per contrastare queste infezioni attraverso l'individuazione dei potenziali fattori di rischio e dell'origine dei focolai.

BIBLIOGRAFIA

- Agdestein A., Johansen T.B., Kolbiornsen O., Jorgensen A., Djonne B., Olsen I. (2012), “A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs”. BMC Vet Res. 8-11.
- Alvarez J., Garcia I. G., Aranaz A., Bezos J., Romero. B., Juan, Mateos A., Gomes-Mampaso, Dominguez L. (2008). “Genetic diversity of *Mycobacterium avium* isolates recovered from clinical samples and from environment: molecular characterization for diagnostic purposes”. J. Clin. Microbiol. 46, 1246-1251.
- Domingos M., Amado A., Botelho A. (2009) “IS1245 RFLP analysis of strains of

- Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal". *Vet Rec.* 164 (4), 116-120.
- Eisenberg T., Volmer R., Eskens U., Moser I., Nessler A., Sauerwald C., Seeger H., Klewer Fromentin-K., Mobius P. (2012). "Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*". *Vet Microbiol.* 159 (1-2), 69-76.
 - Falkinham J.O. III (2009). "Surrounded by *Mycobacteria*: nontuberculous mycobacteria in the human environment". *J Appl Microbiol.* 107, 356-367.
 - Field S. K., Cowie R. L. (2006). "Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria". *Chest.* 129, 1653-1672.
 - 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.
 - Henry M.T., Inamdar L., Riordain D., Schasweiger M., Watson J. P. (2004). "Non tuberculous mycobacteria in non HIV patients: epidemiology, treatment and response". *Eur. Respir J.* 23, 741-746.
 - 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 (CIMID)*. 31, 347 -366.
 - 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.
 - Kunze Z. M., Portaels F., McFadden J. J. (1992). "Biologically distinct subtypes of *Mycobacterium avium* differ in possession of Insertion Sequence IS901". *Journal of Clinical Microbiology.* 2366-2372.
 - Legrand E., Sola C., Rastogi N. (2000). "*Mycobacterium avium*-intracellulare complex: phenotypic and genotypic markers and the molecular basis for interspecies transmission". *Bull. Soc. Pathol Exot.* 93(3), 182-192.
 - 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.
 - Pate M., Ocepek M., Zolnir-Dovc M., Krt B. (2005). "Characterization of genetic diversity of animal and human *Mycobacterium avium* strains by IS1245- IS1311 spacer typing". *Vet. Met.* 50 (4), 175-180.
 - Pate M., Moravkova M., Krt B., Pavlik I., Ocepek M. (2009). "Genotyping of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolates from domestic animals in Slovenia by IS901 RFLP". *Vet. Med.* 54 (6), 270-279.
 - Pavlik I., Jahn P., Moravkova M., Matlova L., Trml F., Cizek A., Nesnalova E., Dvorska -Bartosova L., Halouzks R. (2008). "Lung tuberculosis in a horse caused by *Mycobacterium avium* subspecies *avium* of serotype 2: a case report". *Vet. Med.* 53, 111-116.
 - Radomski N., Thibault V.C., Karoui C., Cruze K., Cochard T., Gutierrez C., Supply P., Biet F., Boschiroli M.L. (2010). "Determination of genotypic diversity of *Mycobacterium avium* Subspecies from human and animal origins by Mycobacterial interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat and IS1311 Restriction fragment length polymorphism typing methods". *Journal of Clinical Microbiology.* 48 (4), 1026-1034.
 - Shin S.J., Lee B. S., Koh W.J., Manning E.J.B., Anklam K., Sreevatsan S., Lambrecht R., Collins M.T. (2010). "Efficient differentiation of *Mycobacterium avium* complex species and

- subspecies by use of five- target multiplex PCR”. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (11), 4057-4062.
- Sinclair K., Challans J.A., Kazwala R.R., Hewinson R.G., Sharp J.M. (1995) “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”. *Vet Microbiol.* 144, 437–448.
 - Thorel M. (1998). “Application du debusquement enzymatique a l’isolement des mycobacteries de l’environnement”. *C.R. Acad. Agric. Fr.* 84, 89-100.
 - 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.
 - Tirkkonen T., Pakarinen J., Rintala E., Ali- Vehmas T., Marttila H., Peltoniemi O., Makinen J. (2010) “Comparison of Variable-Number Tandem-Repeat Markers typing and IS1245 Restriction Fragment length Polymorphism fingerprinting of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* from human and porcine origins”. *Acta Vet Scand.* 52-21.
 - Turenne C. Y., Wallace R. J., Behr M. A. (2007). “*Mycobacterium avium* in the postgenomic era”. *Clin. Microbiol. Rev.* 20:, 205-229.
 - Varello, K., Dondo, A., Richelmi, G., Bozzetta, E., Perosino, M., D’Errico, V., Gorla, M., Giorgi, I., Zoppi, S. (2012). “Lesioni renali da *Mycobacterium avium* subspecies *avium* nel suino: aspetti anatomo-istopatologicic e significato diagnostico”. XIV Congresso Nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento (NA) 24-26 Ottobre 2012, 506-509.
 - 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.
 - Zoppi S., Garrone A., Rossi F., Ferraro G., Sona B., Giorgi I., Gorla M., Tron S., D’Errico V., Alborali G., Zanoni M.G., Dondo A., Baricco G. (2012) “*Mycobacterium avium* subsp. *avium*: forme generalizzate di tubercolosi aviare in un allevamento suino a gestione multi sito”. *Atti Convegno SIPAS.* 38, 142-151.

DINAMICA D'INFEZIONE DI MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES AVIUM IN UN ALLEVAMENTO SUINO A GESTIONE MULTISITO

PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF MYCOBACTERIUM AVIUM SUBSPECIES AVIUM IN A SWINE MULTISITE HERD

ZOPPI, S.¹, VITALE, N.¹, D'ERRICO, V.¹, GIORGI, I.¹, PEROSINO, M.¹, SONA, B.²,
CHIAVACCI, L.¹, BARICCO, G.³, DONDO, A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta;

²Servizio Veterinario ASL CN; ³Libero Professionista Torino

Parole chiave: studio multilivello, tubercolosi suina, prevalenza, *Mycobacterium avium* subspecies *avium*

Key Words: multilevel study, swine tuberculosis, prevalence, *Mycobacterium avium* subspecies *avium*

RIASSUNTO: *Mycobacterium avium* subspecies *avium* causa infezioni solitamente a decorso asintomatico nel suino, tuttavia può essere collegato a gravi forme morbose che possono essere responsabili di ingenti perdite in sede di macellazione. Recentemente sono stati condotti studi sperimentali mirati all'individuazione di test sierologici di ausilio alla diagnosi *in vita* dell'infezione che presentavano il limite di essere applicati su soggetti infettati sperimentalmente. In un allevamento endemicamente infetto è stato possibile definire, utilizzando uno studio multilivello, la dinamica dell'infezione e individuare i punti critici dove poter concentrare le azioni correttive: la sieroprevalenza aumentava all'aumentare dell'età dei soggetti (0% a 2,5 mesi, 10% a 6 mesi, 50% a 9 mesi, oltre il 90% dopo i 2 anni di età) e non era influenzata dalla tipologia produttiva. Il test sierologico pertanto può essere utilizzato come test di screening dei soggetti destinati alla riproduzione se associato ad una corretta gestione igienico-sanitaria delle sale-parto e dello svezzamento.

ABSTRACT: *Mycobacterium avium* subspecies *avium* infection in swine usually occurs symptomless, but it could be linked to severe forms associated with serious losses at the slaughter. Recently, several studies, applied only on experimentally infected pigs, have been focused on the identification of serological tests aimed to the "*in vita*" diagnosis of MAA infection. As it usually occurs when studying a disease experimentally reproduced, those field conditions necessary to fully understand the dynamics of infection are missing. Our goal was to fill this gap by a multilevel study in order to define the dynamics of infection and to identify critical points for corrective actions. It was observed that the seroprevalence increased with increasing age of the subjects (0% 2, 5 months old, 10% at 6 months old, 50% at 9 months old, more than 90% after 2 years old) and it was not influenced by the type of production (breeding vs fattening). The ELISA test could therefore be used as a screening test for gilts selection when combined with proper hygienic procedures in particular concerning of farrowing and weaning sites.

INTRODUZIONE

Mycobacterium avium subsp. *avium* (MAA) e *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*

(MAH) sono membri del *Mycobacterium avium* Complex (MAC), sono largamente presenti nell'ambiente e sono stati isolati da varie specie animali (Biet F. *et al*, 2005). MAA, caratterizzato dalla presenza della sequenza d'inserzione IS901+, è un patogeno primario dei volatili ed è comunemente isolato da animali domestici, ma raramente dall'uomo (Stepanova H. *et al*, 2012).

MAH, essendo invece un patogeno opportunista, ha una larga diffusione ambientale e un ampio spettro d'ospite; è stato isolato più frequentemente nei suini e nell'uomo (Tirkkonen T. *et al*, 2007).

In termini generali, si è però osservato che MAA e MAH possono essere responsabili di gravi infezioni sistemiche in pazienti umani immunocompromessi, come accade in soggetti affetti da HIV (Agdestein A. *et al*, 2012; Slana I. *et al*., 2010).

Nel suino, l'infezione da MAA/MAH decorre usualmente in forma asintomatica, ma può essere fonte di perdite economiche per l'allevatore per gli scarti di carcasse in sede di macellazione.

Recentemente sono stati condotti studi su suidi domestici (Stepanova H. *et al*, 2011) e selvatici (Garrido J.M. *et al*, 2010) che hanno cercato di valutare, utilizzando l'infezione sperimentale, l'andamento della risposta immunitaria nei confronti di MAC sia di tipo anticorpale che di tipo cellulo-mediata.

Stepanova *e coll.* (2012) hanno evidenziato che i suini infetti da MAH mostrano una bassa risposta sia anticorpale che cellulo-mediata, mentre MAA determina una significativa risposta immunitaria con picchi anticorpali a 14 settimane dall'infezione e stabili per il tempo di osservazione (fino a 24 settimane post infezione).

Di conseguenza, il ricorso ad indagini sierologiche *in vita* potrebbe garantire il controllo e la gestione del problema in sede di allevamento, ma tali studi sono sperimentali e monitorano per tempi limitati i suini infetti e mancano in bibliografia indagini condotte in corso di infezione naturale. Inoltre, l'interesse scientifico è limitato nei confronti di MAA rispetto a MAH, in quanto il riscontro di MAA nel suino riguarda solo il 10-20% di tutti i casi di infezione da MAC (Shitaye *et al*, 2006; Domingos *et al*, 2009) e recentemente MAH è stato riconosciuto agente abortigeno e responsabile di infertilità nella scrofa (Eisenberg T. *et al*, 2012). Tuttavia, è stato osservato recentemente (Zoppi S. *et al*, 2012) che anche MAA è in grado di insediarsi, permanere in allevamento e causare gravi forme morbose e scarti di intere carcasse alla macellazione oltre che dare lesioni croniche a livello renale (Varello K. *et al*, 2012).

L'obiettivo di questo progetto è pertanto quello di valutare il trend sierologico dell'infezione mettendo a confronto le diverse tipologie produttive, la localizzazione geografica di ogni sito e l'età degli animali, in modo da definire la dinamica dell'infezione nell'allevamento e individuare i punti critici dove poter concentrare le azioni correttive per migliorare la comprensione dei fattori di diffusione della malattia e contenere le perdite economiche in azienda.

MATERIALI E METODI

Allevamento e Animali

L'oggetto dello studio è un allevamento a ciclo aperto a gestione multisito (Tabella 1) con annesso mangimificio, che provvede all'alimentazione di tutti i settori produttivi (scrofaia, post-svezzamento e ingrasso) già sottoposto a segnalazione dell'infezione da MAA (Zoppi S. *et al*, 2012). 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.

COD ALLEV	comune	PRODUZIONE	n. capannoni	n. animali
1 A	A	post svezz	10	400 ciascuno
2 A	A	ingrasso	20	400 ciascuno
13 B	B	post svezz	8	1500 ciascuno
3 C	C	ingrasso	1	800
4 C	C	ingrasso	2	1100+400
10 D	D	scrofaia	3	1500+700+450
5 D	D	ingrasso	eliminato	
6 D	D	ingrasso	5	250+550+550+550+550
7 D	D	ingrasso	2	1000+1000
8 D	D	ingrasso	2	750+750
9 D	D	ingrasso	5	500+1250+1250+1250+1250
12 E	E	ingrasso	2	1000+500
11 E	E	ingrasso	4	500+500+500+500

Tabella 1: struttura e consistenza dell'allevamento sottoposto a controllo per MAA.

Table 1: management, structure and housing capacity in the swine herd monitored for MAA infection.

Campionamento

Per completezza di indagine, sono stati presi in considerazione anche i campioni prelevati precedentemente da scrofe (n. 59 animali) e scrofette (n. 30 animali) e inclusi nello studio condotto da Zoppi S. *et al* (2012).

Tra il 13/03/2012 e il 17/05/2012 sono stati effettuati prelievi ematici a campione sull'effettivo dell'allevamento (settore post-svezzamento e ingrasso) secondo quanto pianificato e riportato in Tabella 2. Dopo circa 4-5 mesi (30/07/2012 e 17/08/2012) sono stati controllati a campione 15 animali di circa 1 mese, 15 animali di circa 2-3 mesi, 12 animali di 6 mesi (scrofette) e 26 animali di oltre 9 mesi di età (scrofe) del settore riproduzione.

comune	categoria animali	codice	capi	capannoni	prelievo/capannone
A	post svezzamento	1A	12 (24)	2	12 capi
	ingrasso	2A	24 (36)	3	12 capi
B	post svezzamento	13B	36	3	12 capi
C	ingrasso	3C	12	1	12 capi
	ingrasso	4C	24	2	12 capi
D	ingrasso	7D	24	2	12 capi
	ingrasso	8D	12 (24)	2	12 capi
	scrofaia	10D	39 (45)	3	15 capi
	ingrasso	6D	36	3	12 capi
	ingrasso	9D	36	3	12 capi
	ingrasso	5D	eliminato		
E	ingrasso	12E	24	2	12 capi
	ingrasso	11E	36	3	12 capi
Totale			315 (357)		

Tabella 2: campionamento sierologico previsto distribuito per settore produttivo e per sito di allevamento. [tra parentesi il numero di prelievi da eseguire e in grassetto quelli eseguiti].

Table 2: serological sampling procedure based on herd site and type of production (fattening, breeding, post-weaning). [minimum samples required in brackets and effective samples in bold].

Esame sierologico

I campioni di sangue prelevati a campione da ciascun sito di allevamento sono stati analizzati utilizzando un kit ELISA del commercio specifico per *M. avium* (PrioCHECK® *M. avium* Ab porcine, Prionics AG, Switzerland).

Le modalità di esecuzione e i criteri interpretativi sono quelli indicati dalla ditta produttrice.

Analisi statistiche

I dati sierologici sono stati sintetizzati attraverso tabelle e grafici. Per valutare l'associazione tra la positività sierologica ed i seguenti fattori: età dei capi, categoria produttiva, comune, mese è stato eseguito il test statistico chi quadrato. La probabilità di osservare dei positivi al test sierologico data la presenza di uno o più dei fattori considerati è stata stimata attraverso un modello di regressione logistica. Sono stati calcolati gli odds ratio (OR) aggiustati per tutti i fattori considerati. Per le elaborazioni statistiche è stato utilizzato il software SAS@v9.2.

RISULTATI

Nella Tabella 3 sono riportati i risultati ottenuti al test ELISA. Tutti i fattori di analisi sono stati rappresentati: sito allevamento, categoria produttiva (ingrasso, scrofaia, post svezzamento) e distribuzione del campione per capannoni.

I risultati del test statistico chi quadrato evidenziano l'associazione tra test sierologici e tutti e quattro i fattori considerati: comune, età, mese e categoria produttiva.

Comune	ID allevamento	Categoria produttiva	età animali (mesi)	Data Prelievo	Esito test ELISA				
					D	N	P	TOT	POS (%)
A	1A	ingrasso	6	18/04/2012		12		12	0%
		post svezzamento	tra 2 e 4	18/04/2012		24		24	0%
B	13B	post svezzamento	tra 2 e 4	18/04/2012		36		36	0%
C	3C	ingrasso	9	12/03/2012	2	6	4	12	50,0%
	4C	ingrasso	7	12/03/2012	5	15	4	24	37,5%
D	10D	post svezzamento**	2 - 3	13/08/2012		15		15	0%
		scrofaia	oltre 24	*(Zoppi S. et al., 2012)		3	56	59	94,9%
		scrofaia	oltre 9	30/07/2012	5	1	21	27	96,3%
		scrofaia	6	*(Zoppi S. et al., 2012)		17	13	30	43,3%
		scrofaia	6	30/07/2012	5	5	2	12	58,3%
		suinetti sottoscrofa**	1	13/08/2012	1	11	3	15	26,7%
	6D	ingrasso	tra 7 e 9	15/05/2012	2	10		12	16,7%
			tra 8 e 9	15/05/2012	7	17		24	29,2%
	7D	ingrasso	6	20/03/2012	3	20	1	24	16,7%
	8D	ingrasso	9	15/05/2012	4	6	2	12	50,0%
9D	ingrasso	9	20/03/2012	13	20	3	36	44,4%	
E	12E	post svezzamento	tra 2 e 4	27/03/2012	2	21	1	24	12,5%
	11E	ingrasso	tra 7 e 9	27/03/2012	7	27	2	36	25,0%
Totale complessivo					56	246	43	434	22,8%

Tabella 5: esiti del test ELISA suddivisi per comune, allevamento, età degli animali, data di prelievo, positività. [*Sono stati inclusi anche esami precedentemente eseguiti e inclusi in altro studio (Zoppi S. et al., 2012); **analisi supplementari su scrofaia].

Table 5: ELISA test results classified according to site, herd, animal age, sampling date, positivity. [*Test results previously performed and already published (Zoppi S. et al., 2012) are included; **supplementary analysis on sows/gilts].

I risultati del modello di regressione logistica sono mostrati in Tabella 4: i fattori che sono associati alla positività sierologica sono l'età e la categoria produttiva ingrasso.

Sulla base dei risultati ottenuti, considerando esclusivamente il fattore età, si osserva un aumentare della positività sierologica all'aumentare dell'età in tutte le categorie di animali (Figura 1).

Stime degli odds ratio (OR)			
Effetto	Stima puntuale	Limiti di confidenza di Wald al 95%	
INGRASSO	7.201	2.936	17.663
ETA'	1.957	1.639	2.337

Tabella 4: stima degli odds ratio (OR) dei fattori considerati: ingrasso ed età.

Table 4: odds ratio evaluation according to defined factors: fattening and age.

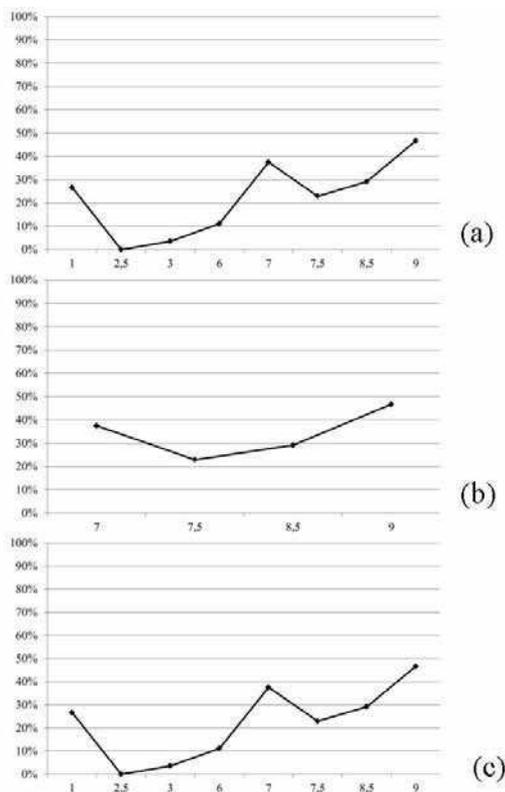


Figura 1: percentuali di positività per età degli animali (espressa in mesi) in tutte le categorie (a), nella scrofaia (b) e nel post svezzamento/ingrasso (c).

Figure 1: positivity rate (%) expressed for age (in month) considering all of categories (a), gilts/sows (b) and post-weaning/fattening (c).

DISCUSSIONE

Dalle indagini pilota la sieroprevalenza attesa all'interno dei siti era molto alta e variava in base all'età e categoria dei capi (Zoppi S. *et al.*, 2012): i dati del presente studio confermano quanto precedentemente osservato.

La positività riscontrata nei suinetti appena svezzati indica una circolazione nella popolazione di anticorpi di origine materna, che scompaiono a partire dal secondo mese di età. Questo dato rafforzerebbe la tesi sostenuta ovvero che l'infezione avvenga nel periodo di stabulazione nella sala parto con conseguente sviluppo di immunità specifica a partire dal terzo mese di età (Stepanova H *et al.*, 2012).

La fonte di infezione sarebbe da individuare nelle lesioni croniche e attive del tratto genito-urinario delle scrofe, in quanto già dimostrata la presenza di tali lesioni in suini regolarmente macellati (Varello K. *et al.*, 2012).

L'eliminazione fecale di MAA in studi di infezione sperimentale è controversa: in alcuni si sostiene che sia presente ma limitata nel tempo (Stepanova H. *et al.*, 2012), in altri casi che sia del tutto assente (Agdestein, A *et al.*, 2012). Nell'allevamento oggetto di studio, la possibilità che si verifichi in ogni caso un'eliminazione fecale transitoria di MAA da parte dei suinetti aumenterebbe la probabilità che l'infezione venga contratta anche da suinetti nati da scrofe "free" al momento del pareggiamento delle nidiate, ma non influirebbe sulle nidiate già contaminate perché nate da madri infette.

Del tutto esclusa in questo caso, visto l'elevato numero di animali coinvolti, l'ipotesi sostenuta da alcuni autori circa l'infezione individuale determinata dal consumo di materiale contaminato da feci di volatili (Pavlik I. *et al.*, 2000).

CONCLUSIONI

La sieroprevalenza media verso MAA osservata nell'allevamento oggetto di studio si attesta attorno al 22-23%, con punte massime nella scrofaia superiori al 90%. Le azioni correttive individuate e attuabili al momento sono in particolare mirate al contenimento della carica infettante e degli effetti collaterali legati all'infezione (scarti alla macellazione); infatti, in un contesto epidemiologico intra-allevamento di questo tipo non è attuabile un programma di eradicazione dell'infezione.

I dati ottenuti confermano che il settore ingrasso è il reparto produttivo maggiormente colpito dall'infezione, pertanto la pianificata eliminazione del centro ingrasso annesso alla scrofaia è da ritenersi un'azione correttiva migliorativa non solo in termini di biosicurezza generale, ma anche specifica per la diminuzione della pressione infettiva esercitata dai soggetti all'ingrasso.

I test *in vivo* specifici per la diagnosi sierologica di MAA possono essere un utile strumento come screening per la scelta dei capi da destinare alla riproduzione se associato ad una corretta gestione igienico-sanitaria delle sale parto e dello svezzamento.

In seguito ai controlli eseguiti, la scelta del proprietario è stata invece più radicale e mirata al rinnovo graduale del parco scrofe contestuale al rafforzamento del trattamento antiparassitario per il controllo sugli animali all'ingrasso degli ascaridi (doppio trattamento con levamisolo 20% al ristallo e dopo 15 giorni – 100Kg), identificati come causa potenziale del passaggio extra-intestinale di MAA e della generalizzazione delle lesioni.

Il processo di rinnovamento del parco scrofe è stato completato recentemente e pertanto sarà possibile valutare l'efficacia di tale operazione con i prossimi dati riferiti alla macellazione delle partite nate dalle nuove scrofe.

BIBLIOGRAFIA

- Agdestein, A., Johansen, T.B., Kolbjørnsen, Ø., Jørgensen, A., Dønne, B., Olsen, I. (2012). “A comparative study of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* in experimentally infected pigs”. BMC Veterinary Research 8:11. doi:10.1186/1746-6148-8-11.
- Biet, F., Boschirolì, M.L., Thorel, M.F., Guilloteau, L.A. (2005). “Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium-intracellulare* complex (MAC)”. Vet. Res. 36, 411–436.
- Domingos M., Amado, A., Botelho, A. (2009) “IS1245 RFLP analysis of strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* isolated from pigs with tuberculosis lymphadenitis in Portugal” Vet Rec 164(4), 116-120.
- Eisenberg, T., Volmer, R., Eskens, U., Moser, I., Nessler, A., Sauerwald, C., Seeger, H., Klewer-Fromentin, K., Möbius, P. (2012). “Outbreak of reproductive disorders and mycobacteriosis in swine associated with a single strain of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*”. Vet. Microbiol. 159, 69–76.
- Garrido, J.M., Vicente, J., Carrasco-Garcia, R., Galindo, R.C., Minguijón, E., Ballesteros, C., Aranaz, A., Romero, B., Sevilla, I., Juste, R., de la Fuente, J., Gortazar, C. (2010). “Experimental infection of Eurasian wild boar with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*”. Vet. Microbiol. 144, 240–245.
- Pavlik, I., Svastova, P., Bartl, J., Dvorska, L., Rychlik, I. (2000). “Relationship between IS901 in the *Mycobacterium avium* complex strains isolated from birds, animals, humans, and the environment and virulence for poultry”. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 212-217.
- Shitaye, J.E., Parmova, I., Matlova, L., Dvorska, L., Horvathova, A., Vrbas, V., Pavlik, I. (2006). “Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues”. Vet. Med. – Czech 51, 497–511.
- 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”. Vet. Microbiol. 144, 437-443.
- Stepanova H., Pavlova B., Stromerova N., Ondrackova P., Stejskal K., Slana I., Zdrahal Z., Pavlik I., Faldyn M. (2012). “Different immune response of pigs to *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* infection”. Vet. Microbiol. 159, 343-350.
- Stepanova, H., Pavlova, B., Stromerova, N., Matiasovic, J., Kaevska, M., Pavlik, I., Faldyna, M. (2011). “Cell-mediated immune response in swine infected with *Mycobacterium avium* subsp. *avium*”. Vet. Immunol. Immunopathol. 142, 107–112.
- Thegerström, J., Marklund, B.I., Hoffner, S., Axelsson-Olsson, D., Kauppinen, J., Olsen, B. (2005). “*Mycobacterium avium* with the bird type IS1245 RFLP profile is commonly found in wild and domestic animals, but rarely in humans”. Scand. J. Infect. Dis. 37, 15–20.
- Tirkkonen, T., Pakarinen, J., Moisander, M., Mäkinen, J., Soinid, H., Ali-Vehmasb, T. (2007) “High genetic relatedness among *Mycobacterium avium* strains isolated from pigs and humans revealed by comparative IS1245 RFLP analysis” Vet. Microbiol. 125, 175–181.
- Varello, K., Dondo, A., Richelmi, G., Bozzetta, E., Perosino, M., D’Errico, V., Gorla, M., Giorgi, I., Zoppi, S. (2012). “Lesioni renali da *Mycobacterium avium* subspecies *avium* nel suino: aspetti anatomo-istopatologicic e significato diagnostico”. XIV Congresso

- Nazionale S.I.Di.L.V., Sorrento (NA) 24-26 Ottobre 2012, 506-509.
- Wallenberg, 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". Vet. Rec. 167, 451-454.
 - 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. (2012). "*Mycobacterium avium* subsp. *avium*: forme generalizzate di tubercolosi aviare in un allevamento suino a gestione multisito". XXXVIII Meeting Annuale S.I.P.A.S., Parma 22-23 Marzo 2012, 142-151

POSTER

VALUTAZIONE DI DUE APPROCCI METAFILATTICI NEL CONTROLLO DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL MAIALE

COMPARISON OF THE EFFICACY OF THE ORAL AND INJECTABLE TREATMENTS IN THE CONTROL OF THE RESPIRATORY DISEASE OF PIG

Bongiovanni E.¹, Minelli G.², Luppi A.³, Martelli P.⁴

¹ *Medico Veterinario, Libero professionista, Cremona*

² *Medico Veterinario, Consulente, Parma*

³ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sez. Reggio Emilia*

⁴ *Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie – Università degli Studi di Parma*

Riassunto

Il presente studio ha lo scopo di verificare l'evoluzione delle manifestazioni cliniche e delle ricadute di malattia in suini sottoposti a diverso trattamento antibatterico (nell'alimento vs parenterale) per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da batteri sensibili in condizioni di campo. L'efficacia del trattamento è stata valutata sulla base a parametri clinici (sintomatologia e percentuale di guarigione e di ricadute) e degli incrementi ponderali giornalieri registrati in due gruppi di 200 animali ciascuno trattati rispettivamente per via parenterale con tulatromicina e con un'associazione di amoxicillina e colistina per via orale.

I risultati hanno evidenziato che nel gruppo con trattamento parenterale vi è stata una riduzione del 50% dei casi di malattia respiratoria e che la comparsa dei casi è avvenuta esclusivamente dopo la cessazione dell'attività antibatterica esplicata dalla molecola in questione. Viceversa, nel gruppo trattato per via orale la malattia si è distribuita omogeneamente su tutto il periodo di osservazione con un picco manifestatosi più precocemente che nel gruppo trattato per via parenterale.

Summary

This study aims at assessing the efficacy of an injectable treatment compared with an in feed medication in the control of the respiratory disease of pigs. The efficacy has been evaluated by the comparison of clinical scores and average daily weight gain in two groups of pigs (200 animals/each), the former treated with tulathromycin and the latter with amoxicillin+colistin. In the parentally treated group the proportion of animals showing clinical signs of respiratory disease has been reduced by 50% and the onset occurred when the antibiotic was under the therapeutic levels. In the orally treated group the appearance of the disease occurred uniformly during the whole duration of the trial, peaking earlier as compared to the injected group.

Parole chiave: suino, antibiotico, tulatromicina, amoxicillina

Key words: pig, antibiotic, tulathormycin, amoxicillin

INTRODUZIONE

In questi anni, accanto all'evoluzione delle tecniche di allevamento con le conseguenti modifiche del sistema suinicolo mondiale, si è assistito ad una ridefinizione anche dei determinanti di malattia ovvero ad una ricollocazione del ruolo patogenetico dei microrganismi rispetto a quanto noto precedentemente in virtù delle crescenti conoscenze che vengono rese disponibili. Le sindromi respiratorie hanno sicuramente subito questa "evoluzione". Per molti anni la patologia respiratoria era espressione di definite entità morbose riferibili all'intervento di uno specifico agente infettivo tanto che si parlava di Rinite Atrofica, di Polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae*, di Pleuropolmonite da *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*, di Pastorellosi, di forme respiratorie da Salmonella o di forme virali (Influenza, Malattia d'Aujeszky) complicate da agenti batterici di irruzione secondaria segnatamente *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *B. bronchiseptica*, *H. parasuis*. Più recentemente ci si è resi conto che la maggior parte della problematica respiratoria negli allevamenti intensivi si correla, da un punto di vista infettivistico, ad una complessa interazione tra molteplici agenti virali e batterici che, per la continuità del ciclo produttivo, trovano costantemente soggetti recettivi all'infezione cui consegue l'instaurazione di condizioni epidemiologiche di persistenza delle infezioni e delle problematiche cliniche ad esse connesse. Non meno importanti, anzi determinanti, in termini di condizionamento delle forme cliniche e dell'epidemiologia delle infezioni, risultano i fattori extramicrobici quali i sistemi di allevamento adottati – management (ciclo continuo, tutto pieno / tutto vuoto, flusso degli animali, segregazione delle fasi produttive), le condizioni ambientali (presenza di gas e polveri, sistemi di ventilazione, qualità dell'aria per temperatura, umidità), il carico di animali, la movimentazione degli animali e la formazione dei gruppi, l'alimentazione, l'applicazione di misure di biosicurezza. Questo contesto assai variegato ha portato alla definizione della problematica respiratoria come COMPLESSO RESPIRATORIO POLIFATTORIALE.

Nelle attuali condizioni dell'allevamento suinicolo, il controllo delle patologie non può più avvalersi del solo contributo della profilassi vaccinale, soprattutto perché ben più ampio appare lo scenario che caratterizza l'approccio ad una 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 e farmacologici 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 e ambientali. L'adozione di particolari **misure gestionali** contribuisce in modo significativo al controllo delle malattie. Di particolare rilievo, oggi, appare anche la necessità di prevedere una riduzione ed ottimizzazione dell'impiego di antibatterici soprattutto attraverso un loro impiego con l'alimento senza tralasciare la necessità che le misure di salvaguardia della salute degli animali allevati possano essere comunque applicate.

Il presente studio ha lo scopo di verificare l'evoluzione delle manifestazioni cliniche e delle ricadute di malattia in suini sottoposti a diverso trattamento antibatterico (nell'alimento vs parenterale) per il controllo della malattia respiratoria acuta spontanea sostenuta da batteri sensibili in condizioni di campo.

L'efficacia del trattamento è stata valutata sulla base a parametri clinici (sintomatologia e percentuale di guarigione e di ricadute) e degli incrementi ponderali giornalieri.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso un allevamento a ciclo chiuso, sito nella provincia di Cremona con pregressi e ripetuti episodi di Malattia Respiratoria nella fase di magronaggio, confermati anche dai rilievi di laboratorio che hanno evidenziato un ruolo preponderante di *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

I suini da inserire nello studio sono stati selezionati nell'ambito di gruppi in cui la presenza di polmonite batterica era stata confermata da lesioni anatomopatologiche, da rilievi microbiologici e su base anamnestica.

Sono stati arruolati nello studio 400 capi di peso corporeo compreso tra 25 e 30 kg che sono stati suddivisi in due gruppi di trattamento : 200 soggetti trattati al giorno 0 con Draxxin (tulatromicina) in un'unica somministrazione intramuscolare al dosaggio di 1ml /40 kg pv; 200 soggetti trattati con medicazione a base di amoxicillina-colistina nel mangime per 7 giorni.

I suini sono stati identificati individualmente tramite apposizione di una marca auricolare al momento dell'inclusione nella prova (giorno 0).

Oltre al trattamento antibiotico previsto dal protocollo, gli animali non dovevano ricevere alcun altro trattamento antibatterico iniettabile o orale ad eccezione dei casi in cui la vita del soggetto fosse a rischio. A tal fine era anche ammessa la somministrazione di farmaci antinfiammatori steroidei e non steroidei (FANS). Ogni trattamento doveva essere registrato e costituire oggetto di valutazione del prodotto testato.

Dal giorno 0 al giorno 21 tutti gli animali coinvolti nello studio venivano sottoposti ad osservazioni cliniche giornaliere, attribuendo un punteggio ai seguenti sintomi: appetito, respiro, tosse, scolo nasale, stato del sensorio oltre alla temperatura rettale. I singoli score sono stati sommati al fine di determinare la gravità complessiva della malattia ad ogni tempo di osservazione.

Un campione randomizzato di 20 suini per gruppo di trattamento è stato pesato individualmente al giorno 0 ed al giorno 21 e sottoposto a prelievi di sangue ai gg. 0, 21 e 42 al fine di evidenziare la presenza di anticorpi nei confronti dei comuni agenti di malattia respiratoria (SIV, ADV, PRRS, PCV2, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*).

Le variabili demografiche, i fattori di rischio, i parametri vitali e i risultati delle indagini batteriologiche sono stati adeguatamente riassunti per ciascun gruppo di trattamento. Le variabili continue sono state riportate come medie, mediane e deviazione standard mentre le variabili discrete saranno riportate come frequenze e percentuali in opportune tabelle di contingenza. Per l'elaborazione statistica dei dati è stata utilizzata le procedure del Sistema di Analisi Statistiche (S.A.S.)

Lo scopo principale dell'inferenza statistica consiste nel valutare se esista un'equivalenza clinica fra i due trattamenti rispetto alla proporzione dei successi nella riduzione della sintomatologia cumulativa basale e nella durata della malattia. Dopo aver valutato l'equivalenza clinica, 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

I risultati relativi alla comparsa della sintomatologia durante il periodo di osservazione sono riportati nella tabella 1.

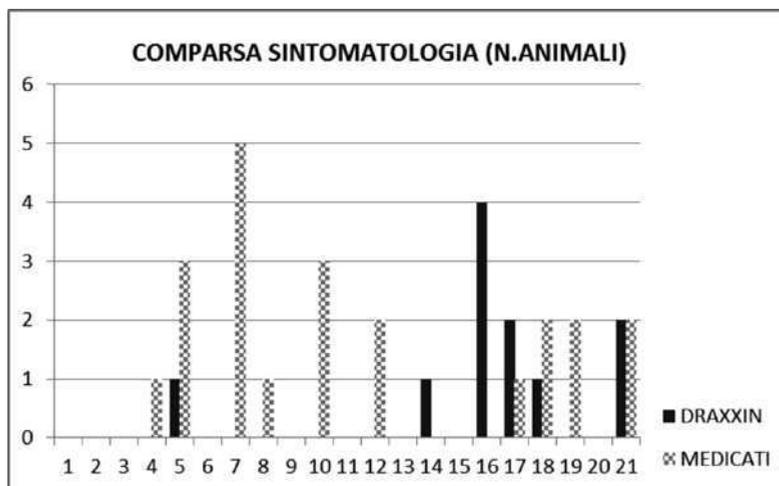


Tabella 1: numero di soggetti che hanno iniziato a manifestare sintomatologia respiratoria
Table 1: number of pigs showing the onset of respiratory clinical signs

Nella tabella 2 viene indicato il numero di trattamenti individuali effettuati per giorno nei due gruppi considerati.

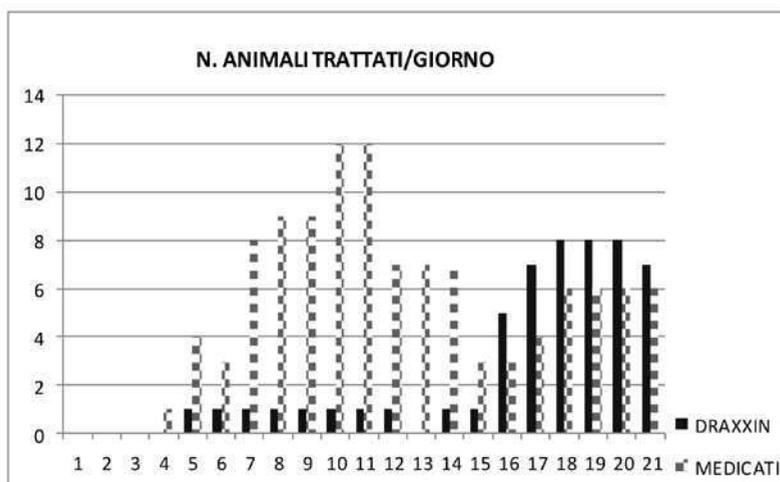


Tabella 2: numero di animali trattati per giorno
Table 2: number of pigs treated/day

L'analisi statistica effettuata ha permesso di individuare una differenza statisticamente significativa per quanto attiene alla comparsa delle manifestazioni cliniche nel tempo nei due gruppi di trattamento. Infatti, si deve notare che nel gruppo di soggetti che hanno ricevuto il trattamento antibiotico nell'alimento, le manifestazioni respiratorie hanno iniziato a fare la loro comparsa assai prematuramente rispetto a quanto registrato nei soggetti del gruppo trattato con antibiotico somministrato per via parenterale.

Inoltre, dei 200 suini trattati per via parenterale a scopo metafilattico, solamente 11 (5,5%) hanno ammalato, richiedendo un ulteriore trattamento terapeutico, mentre dei 200 trattati per via orale ben 22 soggetti (11%) hanno richiesto un trattamento parenterale.

Per quanto attiene alla gravità della malattia osservata nei due gruppi, ottenuta mediante registrazione giornaliera degli score clinici, si evidenzia che la minore incidenza della malattia nel gruppo trattato con tulatromicina si associa ad uno score medio inferiore rispetto a quello dell'altro gruppo (14,8 vs 18,5; $p < 0.05$).

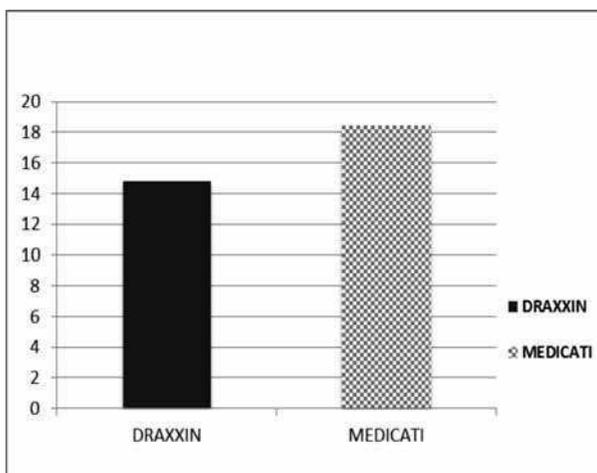


Tabella 3: score clinico medio nei due gruppi considerati

Table 3: mean clinical score.

Le indagini sierologiche effettuate ai 3 tempi considerati hanno permesso di individuare una sieroconversione verso *Actinobacillus pleuropneumoniae* sierotipo 9. Per gli altri determinanti antigenici non sono state evidenziate modificazioni di rilievo che suggeriscano un ruolo significativo nel determinismo della malattia respiratoria osservata.

In riferimento agli incrementi ponderali giornalieri non sono state registrate differenze statisticamente significative al confronto tra i due gruppi considerati (655 ± 116 vs 642 ± 115 ; D vs M).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Dall'esame di risultati emerge che l'approccio metafilattico basato sul trattamento antibiotico iniettabile ha significativamente ridotto la comparsa della malattia respiratoria durante tutto il periodo di osservazione. In particolare, durante i primi 14 giorni, solo un soggetto appartenente al gruppo trattato con tulatromicina ha ammalato, mentre ben 15 animali del gruppo di confronto hanno richiesto un trattamento terapeutico. Tale risultato sostiene

la inconsistenza del trattamento medicato per via orale nel controllo della patologia in discussione, soprattutto in un periodo assai critico come è appunto quello del cosiddetto “ristallo”. Ad ulteriore conferma di quanto sopra considerato, sta la comparsa di alcuni casi di malattia nel gruppo trattato con tulatromicina solamente dopo il 14 giorno, allorquando si presume che l’attività dell’antibiotico si sia esaurita per riduzione della concentrazione ematica e tissutale della molecola sotto la soglia di efficacia. L’aggregazione dei dati evidenzia che l’efficacia del trattamento metafilattico parenterale non si esaurisce nelle prime due settimane ma si protrae per tutto il periodo di osservazione tanto che la percentuale totale di suini che ammalano risulta ridotta del 50%, dato di notevole interesse. Per quanto concerne la valutazione della gravità della malattia si è evidenziato che nel gruppo trattato per via parenterale il valore di score clinico medio è risultato inferiore del 20%, a supporto di una minore entità della sintomatologia.

Gli incrementi ponderali giornalieri non sono risultati diversi da un punto di vista statistico anche se nel gruppo trattato per via parenterale sono numericamente superiori di 13 grammi/die. Considerando la relativa brevità del periodo di osservazione, il parametro zootecnico potrebbe non rivestire una particolare rilevanza.

Considerando la criticità della fase di ristallo, non solo per la maggiore incidenza della malattia respiratoria, quanto per la presenza di elementi penalizzanti la performance quali il cambiamento di ambiente, di alimentazione e di management, il trattamento per via orale non appare in grado di garantire un uniforme e tempestivo effetto antibatterico utile per ridurre l’impatto della malattia respiratoria, come invece appare evidente negli animali trattati per via parenterale in cui viene garantita un’adeguata somministrazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Villarino N, Lesman S, Fielder A, García-Tapia D, Cox S, Lucas M, Robinson J, Brown SA, Martín-Jiménez T. Pulmonary pharmacokinetics of tulathromycin in swine. Part I: Lung homogenate in healthy pigs and pigs challenged intratracheally with lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012 Oct 17. doi:10.1111/jvp.12016.
2. Villarino N, Lesman S, Fielder A, García-Tapia D, Cox S, Lucas M, Robinson J, Brown SA, Martín-Jiménez T. Pulmonary pharmacokinetics of tulathromycin in swine. Part 2: Intra-airways compartments. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012 Oct 16. doi: 10.1111/jvp.12015.
3. Callens B, Persoons D, Maes D, Laanen M, Postma M, Boyen F, Haesebrouck F, Butaye P, Catry B, Dewulf J. Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Prev Vet Med.* 2012 Sep 1;106(1):53-62. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.03.001. Epub 2012 Apr 9. PubMed PMID: 22494905.
4. Wang X, Tao YF, Huang LL, Chen DM, Yin SZ, Ihsan A, Zhou W, Su SJ, Liu ZL, Pan YH, Yuan ZH. Pharmacokinetics of tulathromycin and its metabolite in swine administered with an intravenous bolus injection and a single gavage. *J Vet Pharmacol Ther.* 2012 Jun;35(3):282-9. doi: 10.1111/j.1365-2885.2011.01322.x. Epub 2011 Jul 13. PubMed PMID: 21749408.
5. Savic B, Ivetic V, Milicevic V, Pavlovic I, Zutic M, Gagrein M. Genetic diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates from conventional farrow-to-finish pig farms in Serbia. *Acta Vet Hung.* 2010 Sep;58(3):297-308. doi: 10.1556/AVet.58.2010.3.3. PubMed PMID: 20713321.
6. Sellyei B, Varga Z, Szentesi-Samu K, Kaszanyitzky E, Magyar T. Antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* isolated from swine and poultry. *Acta Vet Hung.* 2009 Sep;57(3):357-67. doi: 10.1556/AVet.57.2009.3.2. PubMed PMID: 19635708.

7. Angen Ø, Andreasen M, Nielsen EO, Stockmarr A, Baekbo P. Effect of tulathromycin on the carrier status of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 in the tonsils of pigs. *Vet Rec.* 2008 Oct 11;163(15):445-7. PubMed PMID: 8849576.
8. Hart FJ, Kilgore RW, Meinert TR, Nutsch RG, Sunderland SJ, Lechtenberg KF. Efficacy of tulathromycin in the treatment of respiratory disease in pigs caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet Rec.* 2006 Apr 1;158(13):433-6. PubMed PMID: 16581993.
9. Nutsch RG, Hart FJ, Rooney KA, Weigel DJ, Kilgore WR, Skogerboe TL. Efficacy of tulathromycin injectable solution for the treatment of naturally occurring Swine respiratory disease. *Vet Ther.* 2005 Summer;6(2):214-24. PubMed PMID: 16094568.
10. Nanjiani IA, McKelvie J, Benchaoui HA, Godinho KS, Sherington J, Sunderland SJ, Weatherley AJ, Rowan TG. Evaluation of the therapeutic activity of tulathromycin against swine respiratory disease on farms in Europe. *Vet Ther.* 2005 Summer;6(2):203-13. PubMed PMID: 16094567.
11. McKelvie J, Morgan JH, Nanjiani IA, Sherington J, Rowan TG, Sunderland SJ. Evaluation of tulathromycin for the treatment of pneumonia following experimental infection of swine with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet Ther.* 2005 Summer;6(2):197-202. PubMed PMID: 16094566.
12. Godinho KS, Keane SG, Nanjiani IA, Benchaoui HA, Sunderland SJ, Jones MA, Weatherley AJ, Gootz TD, Rowan TG. Minimum inhibitory concentrations of tulathromycin against respiratory bacterial pathogens isolated from clinical cases in European cattle and swine and variability arising from changes in vitro methodology. *Vet Ther.* 2005 Summer;6(2):113-21. PubMed PMID: 16094559.
13. Benchaoui HA, Nowakowski M, Sherington J, Rowan TG, Sunderland SJ. Pharmacokinetics and lung tissue concentrations of tulathromycin in swine. *J Vet Pharmacol Ther.* 2004 Aug;27(4):203-10. PubMed PMID: 15305848.

STUDIO MOLECOLARE SULLA RISPOSTA INFIAMMATORIA E IMMUNITARIA IN CORSO DI INFEZIONE NATURALE DA PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV)

MOLECULAR STUDY ON THE INFLAMMATORY AND IMMUNE RESPONSE UPON PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) NATURAL INFECTION

Ferrarini G., Ferrari L., De Angelis E., Martelli P., Borghetti P.

*Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie – Università degli Studi di Parma
Via del Taglio, 10 – 43126 Parma*

RIASSUNTO

Scopo del presente lavoro è stato lo studio della modulazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immunitarie (IFN- γ), anti-infiammatorie (IL-10), nonché di segnali immunoregolatori (FoxP3) in corso di infezione naturale da PRRSV. L'indagine è stata svolta in un allevamento con anamnesi patologica recente supportata da evidenze virologiche di infezione da PRRSV in fase di accrescimento. Sono stati considerati 20 suini suddivisi in due gruppi: 1) gruppo vaccinato a 3 settimane di età contro PRRSV (V-PRRSV) mediante vaccino vivo attenuato (MLV: modified live virus) e 2) gruppo non vaccinato (NV) controllo costituito da animali della stessa età. Gli animali, dopo un periodo post-vaccinale (da 3 a 6 settimane di età) sono stati esposti naturalmente all'infezione presente in allevamento in quanto messi a contatto con animali residenti infetti. Gli animali si sono naturalmente infettati a 8 settimane di vita e la viremia si è mantenuta per circa 8 settimane. In questo periodo, ai due gruppi di suini sono stati effettuati prelievi di sangue a 6, 8, 10, 12, 14, e 16 settimane di età. Su siero sono state effettuate indagini virologiche e su sangue intero è stato effettuato l'isolamento delle PBMC e l'analisi dell'espressione genica in RT-qPCR (retrotrascrizione - PCR quantitativa).

Dai risultati ottenuti si sono potute osservare importanti modulazioni temporali dei marker indagati e differenze significative tra i due gruppi vaccinati e non vaccinati esposti. Per le citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8 e TNF- α), pur senza differenze tra i due gruppi, si è riscontrata una netta riduzione dell'espressione fin dall'inizio dell'infezione, con un ritardato incremento in associazione al picco di viremia. Riguardo all'IFN- γ , è stato possibile rilevare un incremento significativo dell'espressione nel gruppo V-PRRSV nella fase acuta dell'infezione. Per la citochina anti-infiammatoria IL-10 si sono osservati livelli più ridotti negli animali vaccinati precedentemente al picco di espressione a 12 settimane associato ai livelli massimi delle citochine pro-infiammatorie. Diversamente, negli animali esposti/infetti non vaccinati, è stata riscontrata una maggiore espressione genica del fattore di trascrizione FoxP3 per tutto il periodo di infezione.

ABSTRACT

The study aims at evaluating gene expression of pro-inflammatory (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immune (IFN- γ), anti-inflammatory (IL-10) cytokines and immunoregulatory signals (FoxP3) upon PRRSV natural infection. The study was carried out in a herd with recent clinical history of PRRSV infection associated with viremia in growers. Twenty pigs were divided into two groups: 1) the V-PRRSV group was vaccinated at 3 weeks of age against PRRSV with a modified live virus vaccine (MLV) and 2) the NV non-vaccinated group that served as control. Three weeks after vaccination, the animals were co-mingled with resident pigs in order to be naturally exposed

to the resident virus. Animals were naturally infected at 8 weeks of age and the viremia has lasted for about 8 weeks. In this period, blood samples were collected at 6, 8, 10, 12, 14 and 16 weeks of age in both groups. Virological and gene expression (RT-qPCR) analyses were performed in serum and PBMC, respectively. The results highlight relevant marker modulations over time and significant differences between groups. In both groups, the modulation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8, TNF- α) showed a reduction at the beginning of infection and a delayed increase in association with the viremic peak. The IFN- γ course showed a higher gene expression in the V-PRRSV group during the acute phase of infection. Lower expression of IL-10 was observed in vaccinated animals before the peak at 12 weeks associated with the increase of pro-inflammatory cytokines. Differently, in exposed/infected unvaccinated animals, significantly higher gene expression of the transcription factor FoxP3 was observed throughout the period of PRRSV infection.

Parole chiave

Infezione naturale, PRRSV, citochine, FoxP3.

Key words

Natural infection, PRRSV, cytokines, FoxP3.

Introduzione

Il virus della PRRS (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome) è uno dei più diffusi agenti patogeni negli allevamenti suini di tutto il mondo, responsabile di una sindrome riproduttiva e respiratoria causa di gravi danni ad impatto sanitario ed economico. Questo virus è emerso verso la fine agli anni '80 ma nonostante siano passati più di venti anni, le conoscenze su alcuni aspetti essenziali che riguardano le caratteristiche del virus (patogenesi, risposta immunitaria, epidemiologia) appaiono ancora spesso incomplete.

PRRSV induce una risposta innata lenta e debole nei polmoni (Murtaugh e Foss, 2002; Murtaugh et al., 2002), è in grado di causare una bassa induzione (Van Reeth, 1999) o una azione inibitoria (Miller, 2004) di citochine pro-infiammatorie (es. IFN di tipo I, TNF- α) e immunitarie (es. IFN- γ). Gli anticorpi anti-PRRSV sono rilevabili nel siero e nei polmoni dopo circa 10 giorni dall'infezione ma non sono in grado di neutralizzare il virus (Labarque et al., 2000), quindi PRRSV induce una risposta innata e umorale ritardata. Anche la risposta cellulo-mediata indotta da PRRSV è insolitamente lenta a svilupparsi e inefficiente, forse proprio a causa di un'iniziale risposta innata anch'essa lenta e inefficiente. La risposta cellulo-mediata è monitorabile e quantificabile come livelli di cellule secernenti IFN- γ nelle PBMC a circa 3 settimane dopo l'infezione; la frequenza di tali cellule si mantiene generalmente bassa nelle successive 7-9 settimane (Meier et al., 2003). Tra i meccanismi cellulari, l'induzione dei linfociti T regolatori (T_{reg}) è uno dei meccanismi utilizzati da alcuni patogeni per evadere la risposta immunitaria. I linfociti T_{reg} sono coinvolti nell'instaurarsi delle infezioni croniche e persistenti quali le infezioni sostenute da virus dell'immunodeficienza umana (HIV), citomegalovirus, Epstein-Barr virus e virus dell'epatite B (HBV) e C (HCV) in campo umano (Kinter et al., 2004; Vahlenkamp et al., 2005; Voo et al., 2005; Rieger et al., 2006; Peng et al., 2008; Smyk-Pearson et al., 2008).

Recenti studi nel suino hanno dimostrato che nella fase precoce di infezione da PRRSV si osserva l'induzione dell'attività dei linfociti T_{reg} (Silva-Campa et al., 2009, 2010, 2012; Wongyanin et al., 2010; Dwivedi et al., 2011; LeRoith et al., 2011); per questo le indagini sono volte a valutare se questa sottopopolazione sia coinvolta nel ritardo della risposta cellulo-mediata in suini infetti.

Lo scopo del presente lavoro è lo studio della modulazione dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IL-8, TNF- α), pro-immunitarie (IFN- γ), anti-infiammatorie (IL-10) e

di segnali immunoregolatori (FoxP3) implicati nella risposta immunitaria in corso di infezione naturale da PRRSV in animali vaccinati e non vaccinati.

MATERIALI E METODI

Animali

Il lavoro è stato svolto in un allevamento con recente anamnesi patologica di infezione da PRRSV e relativi problemi clinici in fase di accrescimento, supportata da evidenze virologiche. Sono stati considerati 20 suini suddivisi in due gruppi: 1) gruppo vaccinato (10 suinetti) a 3 settimane di età contro PRRSV (V-PRRSV) mediante vaccino vivo attenuato (MLV); 2) gruppo non vaccinato (NV, 10 suinetti) come gruppo controllo della stessa età. La vaccinazione per PRRSV è stata effettuata per via intramuscolare (2 ml) a 3 settimane di vita, utilizzando un vaccino vivo attenuato in commercio (Porcilis PRRS® - MSH Animal Health). Gli animali, dopo un periodo post-vaccinale (da 3 a 6 settimane di età), sono stati esposti naturalmente all'infezione presente in allevamento in quanto messi a contatto con animali residenti infetti. Gli animali si sono naturalmente infettati a 8 settimane di vita e la viremia si è mantenuta per circa 8 settimane. Ai due gruppi di suini sono stati effettuati prelievi di sangue a 3, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 settimane di età. La determinazione della viremia per PRRSV è stata effettuata mediante RT-qPCR nel siero e da sangue intero sono state isolate le cellule mononucleate del sangue (PBMC) su cui è stata condotta l'analisi dell'espressione genica di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-8), citochine immunitarie (IFN- γ , IL-10) e marcatori immunoregolatori (FoxP3) mediante PCR real-time.

Determinazione della viremia per PRRSV

Per la quantificazione dell'RNA virale di PRRSV mediante RT-qPCR, l'RNA totale è stato dapprima estratto da 200 μ l di siero mediante TRIzol LS (Invitrogen) e risospeso in 50 μ L di acqua DEPC. La sintesi di cDNA (RT, retrotrascrizione) è stata effettuata con kit SuperScript II (Invitrogen). La PCR è stata effettuata con termociclatore Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics) utilizzando i seguenti primer: ShS: 5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3' e IZR: 5'-TCGCCCTAATTGAATAGGTGACT-3' modificati da Suárez et al. (1994) e Oleksiewicz et al. (1998), rispettivamente per l'amplificazione di un frammento di 398 paia basi della ORF7 di PRRSV. Una coppia di sonde FRET è stata disegnata considerando la variabilità dei ceppi italiani: 5'-LCRed640-CAGGAAGTGCCTCGCTTTCATCCAG-3' PH e 5'-ATCCAGACGGCTTTCATCAAGGC-3' FL. La PCR real-time è stata effettuata con un protocollo costituito da 10 min. di denaturazione del cDNA e attivazione enzimatica a 95°C, seguita da 40 cicli a 95°C per 10 sec., 58°C per 10 sec. e 72°C per 10 sec. dopo 45 sec. di estensione finale, è stata applicata l'analisi mediante curva di denaturazione per confermare la specificità di reazione (Bonilauri et al., 2007).

Espressione genica di citochine e segnali trascrizionali mediante RT-qPCR in PBMC

Dalle PBMC isolate da sangue periferico mediante gradiente di densità in Histopaque-1077® (Sigma) è stato isolato l'RNA totale mediante kit TRI-Reagent® (Ambion). La retrotrascrizione a cDNA è stata effettuata mediante kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) in termociclatore StepOne (Applied Biosystems) secondo le seguenti condizioni: 25°C per 10 min., 37°C per 120 min. e 85°C per 5 min. La PCR real-time è stata effettuata su stesso termociclatore con chimica SYBR® Green (FAST SYBR® Green-1 Master Mix, Applied Biosystems). I dettagli dei primer utilizzati a concentrazioni ottimizzate sono riportati in tab. 1. Il gene GAPDH è stato utilizzato come controllo endogeno (Borghetti et al., 2012; Ferrari et al., 2013).

Gene	Sequenza	T _m (°C)	Amplicone (pb)
TNF- α	S: 5'-ACTGCACTTCGAGGTTATCGG-3'	59.8	118
	AS: 5'-GGCGACGGGCTTATCTGA-3'	58.2	
IL-1 β	S: 5'-ATGCTGAAGGCTCTCCACCTC-3'	56.3	89
	AS: 5'-TTGTTGCTATCATCTCCTTGCAC-3'	54.5	
IL-8	S: 5'-CCGTGTCAACATGACTTCCAA-3'	53.5	75
	AS: 5'-GCCTCACAGAGAGCTGCAGAA-3'	57.5	
IFN- γ	S: 5'-TGGTAGCTCTGGGAAACTGAATG-3'	60.6	79
	AS: 5'-GGCTTTGCGCTGGATCTG-3'	58.2	
IL-10	S: 5'-TGAGAACAGCTGCATCCACTTC-3'	60.3	114
	AS: 5'-TCTGGTCCTTCGTTTGAAAGAAA-3'	57.1	
FoxP3	S: 5'-CGCATGTTTCGCCTTCTTCA-3'	56.7	68
	AS: 5'-AGGCTCAAGTTGTGGCGAAT-3'	57.3	
GAPDH	S: 5'-GGTGAAGGTCGGAGTGAACG-3'	61.4	70
	AS: 5'-GCCAGAGTTAAAAGCAGCCCT-3'	59.8	

Tab. 1: Dettagli delle coppie di primer utilizzati nell'analisi in real-time PCR. T_m: temperatura di melting; pb: paia basi; S: primer senso; AS: primer anti-senso.

Table 1: Details of the primer pairs used in the real-time PCR analysis. T_m: melting temperature; pb: base pairs. S: sense primer; AS: anti-sense primer.

Le condizioni di PCR sono state le seguenti: 95°C per 20 sec. e 40 cicli a 95°C per 3 sec. e 60°C per 30 sec. I livelli di espressione dei geni considerati sono stati analizzati mediante quantificazione relativa (RQ: relative quantity) con metodo del $\Delta\Delta Ct$.

L'analisi è stata effettuata definendo un gruppo di riferimento per ciascun gruppo sperimentale (V-PRRSV e NV) costituito dagli animali dei due rispettivi gruppi prima della vaccinazione (età: 3 settimane).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante test ANOVA univariata a due fattori e test post-hoc con correzione di SIDAK. Il grado di significatività è stato definito per valori di $p < 0.05$. L'analisi è stata condotta utilizzando il software IBM SPSS Statistics 19 (OBM ITALIA). L'asterisco (*) indica differenze statisticamente significative all'interno di ciascun gruppo, V-PRRSV o NV tra i tempi sperimentali (* = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$). Lettere diverse (a, b) indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi V-PRRSV e NV allo stesso tempo sperimentale.

RISULTATI

Indagini virologiche

Durante il periodo sperimentale analizzato (6-16 settimane di età), è stata determinata la viremia per PRRSV nel siero degli animali appartenenti ai due gruppi considerati (Fig. 1).

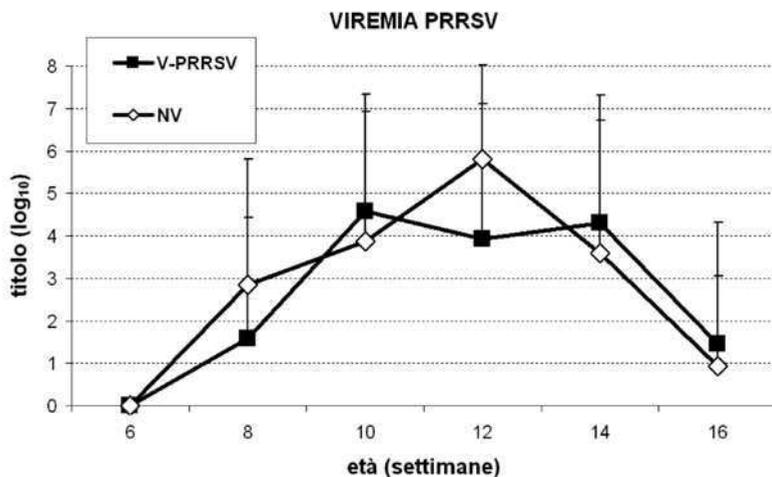


Fig. 1: Carica virale di PRRSV nel siero.

Fig. 1: PRRSV viral burden in serum.

Gli animali sono risultati positivi a PRRSV alla ottava settimana di età. Si è osservato un incremento progressivo della carica virale con picco a 12 settimane nel gruppo di controllo e successiva riduzione tra 14 e 16 settimane in entrambi i gruppi. Non sono state osservate differenze significative tra i due gruppi di animali.

Analisi dell'espressione genica di marker immunitari

L'analisi dell'espressione genica dell'IL-1 β mostra un andamento sovrapponibile tra gruppo vaccinato PRRSV (V-PRRSV) e gruppo non vaccinato (NV) (Fig. 2a). Nel periodo tra 6 e 8 settimane di vita, quando si instaura l'infezione, è possibile osservare un drastico calo dei valori, riduzione che si mantiene costante fino a 10 settimane di vita (6 vs. 10 settimane, $p < 0.05$) sia per il gruppo V-PRRSV che per NV. A 12 settimane si riscontra un picco di espressione ($p < 0.001$); a 14 settimane si osserva una forte riduzione ($p < 0.001$). A 16 settimane si riscontrano valori comparabili a 6 settimane (pre-infezione). Anche per l'IL-8 non si osservano differenze nell'andamento temporale tra i due gruppi di animali considerati. Sia nel gruppo V-PRRSV che nel gruppo NV si osserva una diminuzione dell'espressione genica da 6 a 10 settimane ($p < 0.05$, Fig. 2b). A 12 settimane vi è un significativo incremento e quindi un ritorno a valori basali pre-infezione a 16 settimane.

Per quanto riguarda il TNF- α , la modulazione dell'espressione genica è analoga a quella delle altre due citochine pro-infiammatorie in entrambi i gruppi: i livelli si riducono dalla sesta alla decima settimana in entrambi i gruppi, seppur in modo meno intenso nel gruppo V-PRRSV. Un picco di espressione è osservato anche in questo caso a 12 settimane ed una riduzione intensa è osservata due settimane dopo. Un aumento successivo in entrambi i gruppi è rilevato a 16 settimane di età (Fig. 2c).

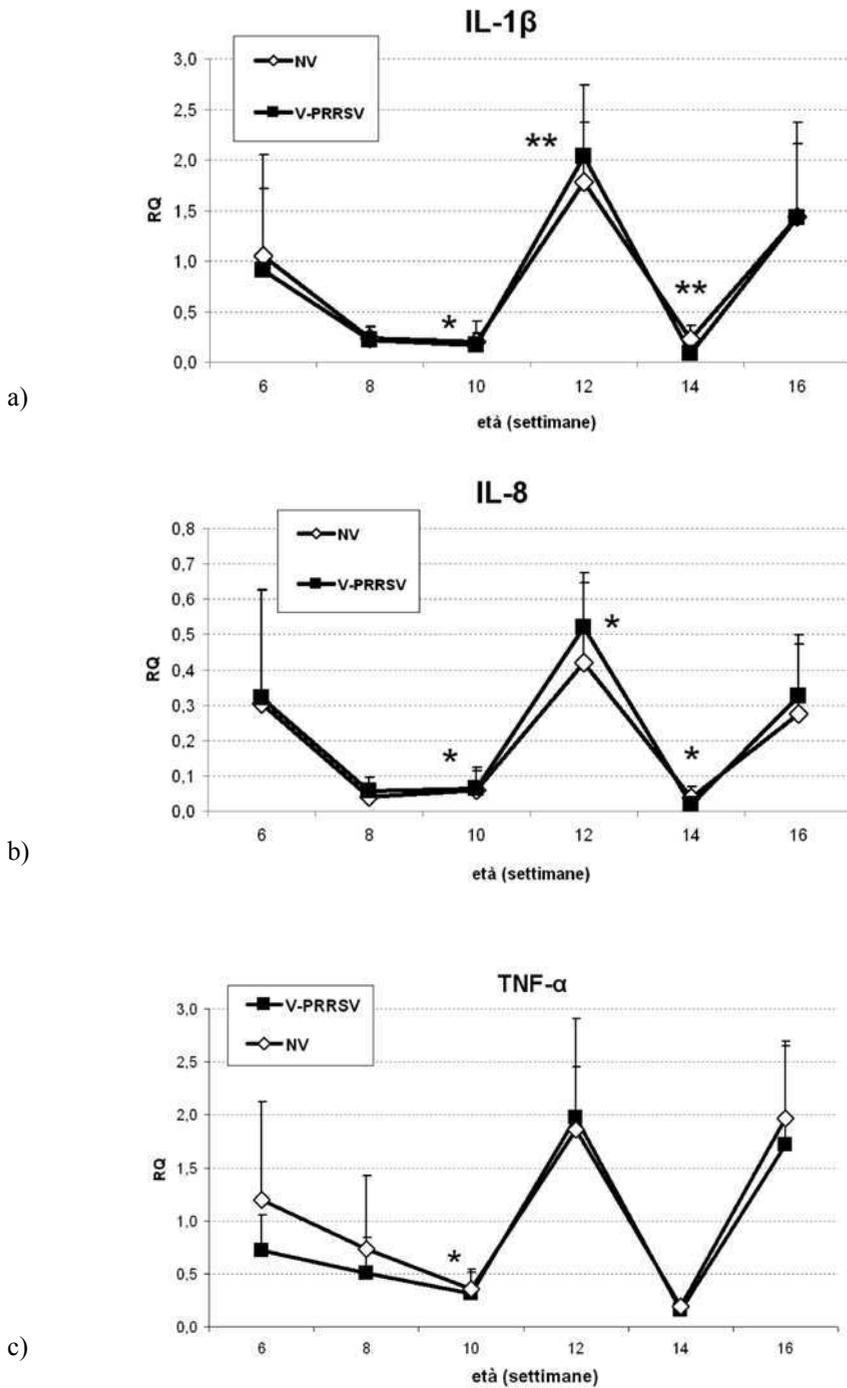


Fig. 2: Espressione genica di IL-1 β , IL-8 e TNF- α in PBMC.
Fig. 2: Gene expression of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in PBMC.

L'espressione genica di IFN- γ mostra un differente comportamento temporale nei due gruppi considerati, particolarmente evidente dall'ottava alla dodicesima settimana di età, nel periodo di infezione (Fig. 3). Nel gruppo vaccinato (V-PRRSV) si verifica un significativo incremento dell'espressione genica di IFN- γ nel tempo con valori alla decima ($p<0.01$) e dodicesima ($p<0.05$) settimana significativamente maggiori anche rispetto al gruppo NV (a vs. b) in cui gli incrementi dalla sesta alla dodicesima settimana di età non sono significativi. Dalla dodicesima alla quattordicesima settimana si osserva una diminuzione, in accordo con la riduzione della viremia in entrambi i gruppi.

Anche l'analisi dell'espressione dell'IL-10, pur nell'ambito di un andamento temporale pressoché simile, ha mostrato alcune differenze tra i due gruppi considerati, NV e V-PRRSV (Fig. 4). È stata rilevata un'espressione mediamente più elevata nel gruppo NV soprattutto nel periodo iniziale di infezione (8-10 settimane) seppur caratterizzata da ampia variabilità. A 12 settimane si nota un picco di espressione risultato significativo per il gruppo V-PRRSV ($p<0.01$) rispetto ai valori a 10 settimane, seguito da una successiva riduzione.

Il profilo temporale di espressione di FoxP3 mostra differenze altamente significative ($p<0.001$) tra i due gruppi di animali (Fig. 5). Infatti, i livelli risultano maggiori nel gruppo NV rispetto al gruppo vaccinato V-PRRSV per tutto il periodo di infezione, mantenendosi persistentemente più elevati anche a 12 e 14 settimane, indipendentemente dall'abbassamento della viremia.

In particolare, da 8 a 12 settimane si nota un aumento progressivo di espressione che tende a decrescere lievemente solo a 14 settimane in concomitanza con la riduzione della viremia. Negli animali vaccinati (V-PRRSV), l'espressione di FoxP3 si è mantenuta pressoché costante, senza variazioni statisticamente significative nel tempo.

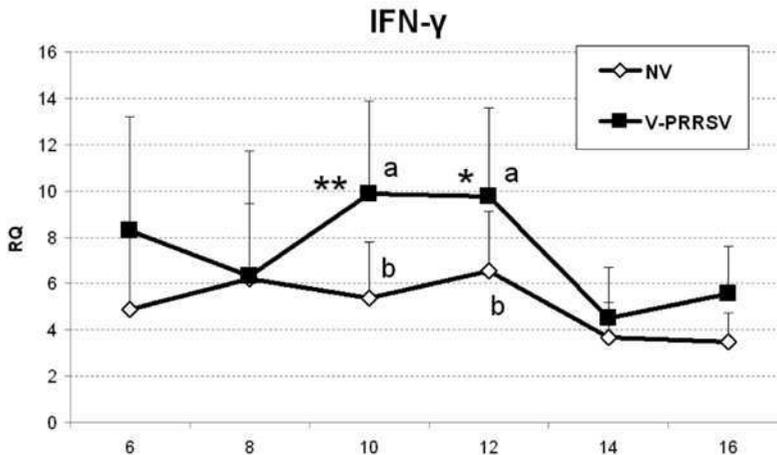


Fig. 3: Espressione genica di IFN- γ in PBMC
Fig. 3: Gene expression of IFN- γ in PBMC.

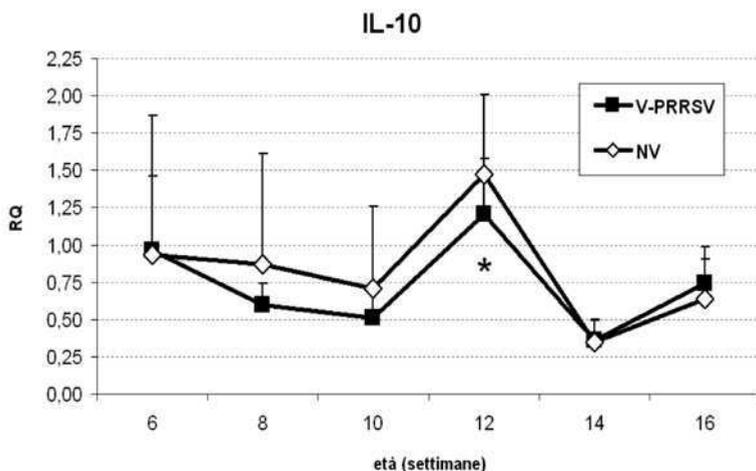


Fig. 4: Espressione genica di IL-10 in PBMC.

Fig. 4: Gene expression of IL-10 in PBMC.

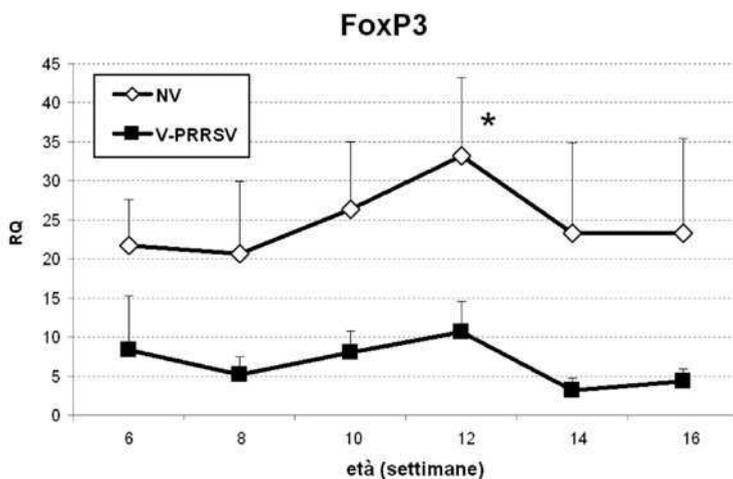


Fig. 5: Espressione genica di FoxP3 in PBMC.

Fig. 5: Gene expression of FoxP3 in PBMC.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

PRRSV causa un'infezione caratterizzata da una viremia che generalmente ha la durata di un mese ed è seguita da una fase di persistenza all'interno dei tessuti linfoidi per 4-6 mesi.

Il meccanismo con cui PRRSV evade/altera la risposta immunitaria è ancora parzialmente sconosciuto. È noto che durante l'infezione si sviluppano sia una risposta immunitaria cellulo-mediata sia umorale, ma il loro specifico ruolo nella protezione e nell'eliminazione del virus dai tessuti non è completamente conosciuto (Thanawongnuwech et al., 2010).

PRRSV può riconoscere ed interagire con i macrofagi, le cellule dendritiche a livello

alveolare e del tratto riproduttivo. I macrofagi infettati, in particolare i macrofagi polmonari alveolari sialoadesina-positivi (PAM), trasportano rapidamente il virus nei linfonodi, organi linfoidi, polmoni e in maniera minore in altri tessuti (Silva-Campa et al., 2009). L'infezione delle cellule coinvolte nella risposta difensiva determina una down-regolazione di citochine infiammatorie, compromettendo la risposta immunitaria innata e conseguentemente anche la risposta adattativa.

Lo scopo del presente studio è stato la valutazione dell'espressione genica di alcune fondamentali citochine ad azione pro-infiammatoria (IL-1 β , IL-8, TNF- α) e pro-immunitaria (IFN- γ) in associazione a citochine anti-infiammatorie (IL-10) e a segnali immunoregolatori trascrizionali (FoxP3) in corso di infezione naturale da PRRSV al fine di poter comprendere come il virus sia in grado di modulare la risposta immunitaria ma anche di poter identificare ulteriori parametri di valutazione di tale modulazione.

Dai dati ottenuti è stato possibile trarre alcune considerazioni sugli andamenti temporali di tali mediatori a conferma ed ulteriore definizione del ruolo patogenetico di PRRSV nei suoi meccanismi di interazione con la risposta immunitaria del suino.

I livelli di IL-1 β e IL-8 hanno un andamento sia temporale sia di intensità di espressione molto simili tra loro. È evidente un marcato decremento dei livelli di espressione di tali citochine nella fase precoce di infezione con un innalzamento tardivo solo in concomitanza con il picco della viremia. Questo tipo di modulazione temporale conferma che PRRSV determina una precoce inibizione della risposta infiammatoria e immunitaria innata mediante una precoce "down-regulation" dei principali segnali della sua attivazione (Darwich et al., 2010), almeno nel periodo iniziale di infezione, ed un evidente ritardo (5-6 settimane) della loro risposta nel tempo (Van Reeth et al., 1999, 2000; Meier et al., 2003; Royae et al., 2004). Per quanto riguarda il TNF- α , si evidenzia una mancata risposta in fase precoce meno evidente come abbassamento e alterazione dei livelli di espressione, ma comunque con netto ritardo del picco di successivo incremento, analogamente a quanto osservato per le citochine precedenti. Questi risultati sono in accordo con Thanawongnuwech et al. (2010), seppur tale studio sia stato condotto su macrofagi alveolari polmonari.

È da sottolineare che non sempre l'effetto di PRRSV sulle citochine pro-infiammatorie è risultato univoco in senso inibitorio. In alcuni studi alcune citochine, in particolare IL-1 β e IFN- γ hanno evidenziato un precoce seppur transitorio incremento durante l'infezione naturale (Borghetti et al., 2011). Ne consegue che, come ormai assodato ed accettato, differenti isolati di PRRSV possano esprimere differenti capacità di indurre o inibire le citochine precoci dell'immunità innata.

Anche in questo caso, una possibile spiegazione dei risultati ottenuti potrebbe essere legata alle caratteristiche intrinseche dell'isolato implicato nell'infezione in termini di patogenicità ed immunogenicità in quanto alcuni isolati possono inibire fin dalle fasi iniziali la risposta pro-infiammatoria, renderla transitoria e debole, oppure ritardarla nel tempo (Royae et al., 2004; Mateu e Diaz, 2008; Borghetti et al., 2011).

Quanto di rilevante ha mostrato questo studio è che l'infezione naturale da PRRSV è caratterizzata da un'iniziale inibizione a cui fa seguito un picco molto tardivo delle due citochine tipicamente coinvolte nell'attivazione precoce della risposta innata (IL-1 β e IL-8); inoltre, si osserva una marcata posticipazione della risposta mediata da TNF- α che più specificatamente sostiene il mantenimento della risposta cellulare innata e la produzione di citochine pro-immunitarie come l'IFN- γ .

Per quanto riguarda le citochine pro-infiammatorie, non si riscontrano differenze nella risposta durante l'infezione, tra animali non vaccinati e vaccinati. Sembra pertanto che la somministrazione del vaccino non porti a variazioni nella modulazione di questi tre geni

codificanti per mediatori pro-infiammatori, questo in parziale contrasto con quanto osservato in precedenti lavori (Borghetti et al., 2011). Ancora una volta, tale diverso riscontro, potrebbe essere spiegato dal fatto che, in base alle caratteristiche intrinseche di patogenicità/immunogenicità, gli isolati implicati in condizioni diverse di infezione naturale potrebbero aver diversamente interagito sulla attivazione della risposta immunitaria anche indotta da una precedente vaccinazione.

Si potrebbe ipotizzare che l'isolato di PRRSV responsabile dell'infezione naturale oggetto del presente studio sia stato in grado di interagire fortemente, o debolmente, con l'attivazione della risposta innata, come caratteristica intrinseca della risposta di tale patogeno, e riduca comunque, nell'uno o nell'altro caso, in fase precoce di infezione, l'attivazione delle componenti cellulari responsabili dell'espressione/produzione di tali citochine.

Contrariamente, si potrebbe anche ipotizzare che l'isolato implicato possa aver determinato l'induzione/mantenimento di una immunoregolazione inibitoria fisiologica correlata alla fase di vita dell'animale. Tale effetto inibitorio non verrebbe contrastato dalla precedente vaccinazione, a conferma che l'effetto del vaccino può avere un ruolo variabile nell'attivazione delle componenti precoci della risposta difensiva. Ciò spiegherebbe anche l'effetto protettivo di intensità diversa, anche scarsa, che si osserva a seguito della vaccinazione.

Altre considerazioni sorgono quando sono analizzati gli andamenti temporali delle citochine pro-immunitarie tardive e specifiche (IFN- γ) e delle citochine/segnali immuno-regolatori (IL-10, FoxP3).

Per quanto attiene all'IFN- γ , l'infezione di per sé induce un lento e limitato incremento dopo 2-3 settimane dall'inizio dell'infezione, mentre nei soggetti vaccinati si osserva una maggiore efficienza e un rapido innalzamento della citochina in concomitanza con il periodo di innalzamento della viremia. L'andamento ritardato dell'IFN- γ , in corso di infezione da PRRSV, è in accordo con quanto descritto da diversi autori (Meier et al., 2003; Royae et al., 2004;). Analogamente, a differenza di quanto osservato per le citochine pro-infiammatorie, si conferma (Borghetti et al., 2011) che la vaccinazione è in grado di sostenere una maggior espressione genica di IFN- γ rispetto agli animali non vaccinati, come dimostrato sia in espressione genica sia come secrezione di proteina mediante tecnica ELISpot (Martelli et al., 2009).

Anche l'andamento temporale della citochina anti-infiammatoria e immunosoppressiva IL-10 appare simile tra i due gruppi, ad eccezione del periodo iniziale dell'infezione quando risulta mediamente più elevata nel gruppo dei soggetti non vaccinati. L'espressione di IL-10 mostra un massimo in coincidenza con il picco della viremia, in associazione con la massima espressione delle citochine pro-infiammatorie. La ritardata risposta legata all'IL-10 appare in relazione all'incremento tardivo delle citochine pro-infiammatorie che deve controbilanciare in relazione al suo ruolo di fattore di "spegnimento" della risposta infiammatoria. Contrariamente, è importante rilevare che i valori più elevati di IL-10 in fase iniziale di infezione negli animali non vaccinati potrebbero spiegare il riscontro della minore risposta di IFN- γ negli stessi e quindi un effetto diretto di PRRSV sull'espressione di tale citochina.

Diversi studi ritengono che l'espressione di IL-10 possa essere un importante meccanismo di modulazione della risposta dell'ospite in corso di infezione da PRRSV poiché promuove l'evasione di PRRSV dalla risposta immunitaria, inibendone un corretto sviluppo (Johnsen et al., 2002; Suradhat et al., 2003; Diaz et al., 2006), nonché potrebbe influenzare l'efficacia della risposta difensiva con ripercussione anche sullo score clinico (Borghetti et al., 2011).

Dopo l'infezione sia con ceppo europeo che americano, i livelli di IL-10 aumentano sia come espressione genica che come secrezione di proteina nel BALF (Suradhat e Thanawongnuwech,

2003). Analogamente, è riportato che l'espressione di IL-10 può essere diversamente indotta o inibita in base all'isolato di PRRSV con cui l'animale viene a contatto (Darwich et al., 2010).

Da questo studio si evince che la determinazione dell'IL-10, più che delle citochine infiammatorie, rimane un marker importante per valutare le modulazioni della risposta infiammatoria/innata ma con significatività ed intensità legati alle caratteristiche intrinseche del virus isolato che determina l'infezione. L'effetto immunosoppressivo della IL-10 può però essere maggiormente valutabile attraverso lo studio di meccanismi legati alla fase di regolazione inibitoria della risposta immunitaria.

A tal proposito, è stata valutata l'espressione del fattore di trascrizione FoxP3, marker specifico dei linfociti T_{reg} . Questo fattore promuove il differenziamento dei linfociti T naive in linfociti T_{reg} , fisiologicamente coinvolti nell'omeostasi della risposta immunitaria e nella regolazione inibitoria di "spegnimento".

Recenti studi, in accordo con il presente, hanno mostrato che l'infezione da PRRSV induce un incremento dei linfociti T_{reg} a 14 giorni dall'infezione, e che questo è positivamente correlato con i livelli di viremia. Nel presente studio si è riscontrato una netta differenza di espressione del gene che codifica per il fattore di trascrizione FoxP3 tra gli animali vaccinati e non vaccinati per tutta la durata dell'infezione naturale da PRRSV.

Il gruppo vaccinato (V-PRRSV) ha mostrato una bassa espressione di FoxP3, a sostegno di una bassa attivazione dei linfociti T_{reg} , e dunque di una risposta immunitaria cellulo-mediata Th1 protettiva in senso antivirale che si può sviluppare più adeguatamente. Contrariamente, nel gruppo controllo (NV), si è osservata una maggiore espressione e quindi una maggior attivazione dei linfociti T_{reg} , con una potenziale inibizione della risposta immunitaria difensiva. Due potrebbero essere le spiegazioni funzionali della differente modulazione del fattore trascrizionale FoxP3 durante l'infezione naturale da PRRSV nei due gruppi di animali considerati: 1) la somministrazione del vaccino ha stabilizzato a bassi livelli l'espressione di questo gene "antagonista", che viceversa sarebbe attivato direttamente dall'interazione del virus con le cellule immunitarie; 2) l'elevata espressione pre-infezione che si osserva nel gruppo controllo (NV) potrebbe essere legata a un'elevata espressione fisiologica di FoxP3 in relazione all'età (animali giovani nel periodo post-svezzamento) (Wen et al., 2012) mentre, al contrario, la vaccinazione, già in fase pre-infezione, potrebbe aver "educato" la risposta immunitaria in senso Th1, mantenendola nel tempo cosicché nel periodo di infezione non si verifica quell'incremento significativo di FoxP3 che si osserva negli animali non vaccinati in concomitanza con l'infezione e l'incremento dei livelli di viremia.

Dai risultati ottenuti e dal confronto con la letteratura, si possono evidenziare alcune considerazioni conclusive sull'importanza di conoscere il pattern citochinico sia come andamento temporale che come livelli di espressione genica durante l'infezione da PRRSV in relazione alle caratteristiche intrinseche dell'isolato implicato in termini di patogenicità/immunogenicità:

- 1) l'infezione da PRRSV inibisce e ritarda l'attivazione della produzione delle citochine pro-infiammatorie;
- 2) l'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie può essere modulata diversamente a seconda dell'isolato causa di infezione e la vaccinazione può esprimere un effetto variabile su tale modulazione;
- 3) la vaccinazione riduce l'effetto negativo sull'espressione di IFN- γ ;
- 4) la vaccinazione potrebbe avere un effetto protettivo sul meccanismo inibitorio causato dall'infezione da PRRSV riducendo l'effetto dell'IL-10, ma soprattutto del fattore trascrizionale FoxP3, marker specifico dei linfociti T_{reg} .

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bonilauri P., Bonci M., Meriardi G., Dottori, M. (2007) Development and validation of real time (FRET probe) PCR for detection of PRRSV (EU). In: Proceedings of the 5th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Krakow, 24-27 June 2007, 194.
- 2) Borghetti P., Saleri R., Ferrari L., Morganti M., De Angelis E., Franceschi V., Bottarelli E., Matrelli P. (2011) Cytokine expression, glucocorticoid and growth hormone changes after porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV-1) infection in vaccinated and unvaccinated naturally exposed pigs. *Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis.*, 34, 143-155.
- 3) Borghetti P., Morganti M., Saleri R., Ferrari L., De Angelis E., Cavalli V., Cacchioli A., Corradi A., Martelli P. (2012) Innate pro-inflammatory and adaptive immune cytokines in PBMC of vaccinated and unvaccinated pigs naturally exposed to porcine circovirus type 2 (PCV2) infection vary with the occurrence of the disease and the viral burden. *Vet. Microbiol.* (in stampa).
- 4) Darwich L., Diaz I., Mateu E. (2010) Certainties, doubts and hypotheses in porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunology. *Virus Res.* 154, 123-132.
- 5) 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. *Virology* 351, 249-259.
- 6) Dwivedi V., Manickam C., Patterson R., Dodson K., Weeman M., Renukaradhya G.J. (2011). Intranasal delivery of whole cell lysate of *Mycobacterium tuberculosis* induces protective immune responses to a modified live porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine in pigs. *Vaccine* 29, 4067-4076.
- 7) Ferrari L., Martelli P., Saleri R., De Angelis E., Cavalli V., Bresaola M. Benetti M., Borghetti P., 2013. Lymphocyte activation as cytokine gene expression and secretion is related to the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) isolate after *in vitro* homologous and heterologous recall of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from pigs vaccinated and exposed to natural infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 151, 193-206.
- 8) Johnsen C.K., Botner A., Kamstrup S., Lind P., Nielsen J. (2002) Cytokine mRNA profiles in bronchoalveolar cells of piglets experimentally infected in utero with porcine reproductive and respiratory syndrome virus: association of sustained expression of IFN- γ and IL-10 after viral clearance. *Viral Immunol.* 15, 549-556.
- 9) Kinter A.L., Hennessey M., Bell A., Kern S., Lin Y., Daucher M., Planta M., Mc Glaughlin M., Jackson R., Ziegler S.F., Fauci A.S. (2004) CD25(+)CD4(+) regulatory T cells from the peripheral blood of asymptomatic HIV-infected individuals regulate CD4(+)CD8(+) HIV specific T cell immune responses *in vitro* and associated with favorable clinical markers of disease status. *J. Exp. Med.*, 200, 331-343.
- 10) Labarque G.G., Nauwynck K.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.
- 11) LeRoith T., Hammond S., Todd S.M., Ni Y., Cecere T., Pelzer K.D. 2011 A modified live PRRSV vaccine and the pathogenic parent strain induce regulatory T cells in pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 140, 312-316.
- 12) Martelli P., Gozio S., Ferrari L., Rosina S., De Angelis E., Quintavalla C., et al. (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.

- 13) Miller L.C., Laegreid W.W., Bono J.L., Chitko-McKown C.G., Fox J.M. (2004) Interferon type I response in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-infected MARC-145 cells. *Arch. Virol.* 149, 2453-2463.
- 14) Mateu E. e Diaz I. (2008) The challenge of PRRS immunology. *Vet. J.* 177, 345-351.
- 15) Meier W.A., Galeota J., Osorio F.A., Husmann R.J., Scnitzlen W.M., Zuckermann F.A. (2003) Gradual development of the interferon- γ response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. *Virology*, 309, 18-31.
- 16) Murtaugh M.P. e Foss D.L. (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 109-121.
- 17) Murtaugh M.P., Xiao, Z., Zuckermann F. (2002). Immunological responsive of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viral Immunol.* 15, 533-547.
- 18) 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.
- 19) Peng G., Li S., Wu W., Sun Z., Chen Y., Chen Z. (2008) Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunol.* 123, 57-65.
- 20) Rieger K., Loddenkemper C., Maul J., Fietz T., Wolff D., Terpe H., et al. 2006 Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD. *Blood* 107, 1717-1723.
- 21) Royae A.R., Husmann R.J., Dawson H.D., Calzanda-Nova G., Schnitzlein W.M., Zuckermann F.A., Lunney J.K. (2004) Deciphering the involvement of innate immune factors in development of the host response to PRRSV vaccination. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 102, 199-216.
- 22) Silva-Campa E., Flores-Mendoza L., Resendiz M., Pinelli-Saavedra A., Mata Haro V., Mwangi W., Hernandez J. (2009). Induction of T helper 3 regulatory cells by dendritic cells infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virol.* 387, 373-379.
- 23) Silva-Campa E., Cordoba L., Fraile L., Flores-Mendoza L., Hernandez J. (2010) European genotype of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRSV) infects monocyte-derived dendritic cells but does not induce Treg cells. *Virol.* 396, 264-271.
- 24) Silva-Campa E., Mata-Haro V., Mateu E., Hernandez J. (2012) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+FoxP3+ regulatory T cell (Tregs). *Virol.* 430, 73-80.
- 25) Smyk-Pearson S., Golden-Meson L. Klarquist J., Burton Jr J.R., Tester I.A. Wang C.C. et al. (2008) Functional suppression by FoxP3+CD4+CD25+(high) regulatory T cells during acute hepatitis C virus infection. *J. Infect. Dis.* 197, 46-57.
- 26) Suárez P., Zardoya R., Prieto C., Solana A., Tabarés E., Bautista J.M., Castro J.M. (1994) Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.* 135, 89-99.
- 27) Surhadat S. e Thanawongnuwech R. (2003) Upregulation of interleukin-10 gene expression in the leucocytes of pigs infected with porcine reproductive respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.* 84, 2755-2760.
- 28) Thanawongnuwech R. e Suradhat S. Taming PRRSV: revisiting the control strategies and vaccine design. *Virus Res.* 154, 133-140.
- 29) Vahlenkamp T.W., Tompkins M.B., Tompkins W.A. (2005) The role of CD4+CD25+ regulatory T cells in viral infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 108, 219-225.
- 30) Van Reeth K., Labarque G., Nauwynck H., Pensaert M. (1999) Differential production of proinflammatory cytokines in the pig lung during different respiratory virus infections: correlations with pathogenicity. *Res. Vet. Sci.* 67, 47-52.
- 31) Van Reeth K. e Nauwynck H. (2000) Proinflammatory cytokines and viral respiratory disease in pigs. *Vet. Res.* 31, 187-213.

INTERPRETAZIONE DEI SIEROPROFILI COME STRUMENTO PER DEFINIRE IL PROGRAMMA DI CONTROLLO DELLA PRRS

SERUMPROFILE INTERPRETATION AS A TOOL TO DEFINE THE PRRS CONTROL PROGRAM

LLOPART D., RODRIGUEZ I., TORRENTS D., ROLLA G.

Laboratorios Hipra, SA, 17170 Amer, Girona, Spagna

Parole chiave : Sieroprofilo, PRRS, programma di controllo

Key words: Serumprofile, PRRS, control program

Riassunto

La diagnosi sierologica della PRRS è di fondamentale importanza, al fine di prendere le decisioni appropriate in ciascuna azienda, per evitare l'impatto di un nuovo ceppo di PRRS. Abbiamo fatto sieroprofili trasversali dei diversi animali presenti negli allevamenti (scrofette, scrofe, suinetti e suini da ingrasso) di diversi paesi europei per un totale di 200 allevamenti di suini. La media del campione per gruppo è stato di 7 campioni di siero. I campioni sono poi stati testati con ELISA. L'analisi dei risultati e le informazioni inerenti lo stato sanitario delle mandrie e i programmi vaccinali in essere, hanno permesso di individuare 3 modelli di infezione relativi a 3 diverse condizioni epidemiologiche legate alla PRRS. Questi modelli permettono al veterinario di monitorare e prendere le decisioni appropriate in funzione dello stato epidemiologico di ogni allevamento per il controllo della sindrome PRRS.

Abstract

The serum profile interpretation on PRRS is very important to be able follow the right approach in any farm and avoid any impact due to PRRS different strain. We made a serum profile data collection in different group of animals (gilts, sows, piglets and fattening pigs) in a certain moment in different countries around EU with a total of 200 farms. We collected 7 serum samples for each animal group. The samples were been tested with ELISA kit. The results interpretation together with the healthy status in the farm and the vaccination control program, gave us the opportunity to identify 3 models related to infection linked to 3 different epidemiological status on PRRS. Those models are an opportunity for the vet to interpretate the PRRS status in the farm and take the correct decision to start with a PRRS disease control program

INTRODUZIONE

La PRRS era un problema, è un problema e sarà un problema. Lo scopo del veterinario che sta affrontando questa malattia è di ottenere una popolazione di animali immunologicamente stabilizzati contro la patologia. Gli elementi di base nella gestione della PRRS sono: introdurre nuovi animali nell'allevamento (scrofette da rimonta) correttamente immunizzati, per ridurre al minimo la circolazione del virus selvaggio nelle scrofe e di tenerli ben protetti, e, infine, di essere in grado di determinare se il virus selvaggio è in circolazione nei suini in accrescimento, in aggiunta, è necessario valutare se coinfezioni con altre patologie respiratorie peggiorano i segni clinici respiratori. La diagnosi sierologica della PRRS è di fondamentale importanza, al fine di prendere le decisioni appropriate in ciascuna azienda, per evitare l'impatto di un nuovo ceppo di PRRS. Uno degli strumenti diagnostici più utilizzato è il sieroprofilo trasversale, al fine di analizzare l'intera popolazione presente in allevamento, al fine di poter prendere decisioni per il controllo PRRS in azienda

MATERIALI E METODI

Abbiamo fatto sieroprofili trasversali dei diversi animali presenti negli allevamenti (scrofette, scrofe, suinetti e suini da ingrasso) in un certo momento. Le scrofe sono state raggruppate per età (n. di parti), sono stati campionate (da 70 a 100 giorni di gestazione) e dei suinetti e suini da ingrasso sono stati campionati in base alle settimane di età (4,7,10,13,16,19,21 e 24). Il campione di sangue è stato sierato e la quantità dei campioni per gruppo dipendeva dalla dimensione dell'azienda e dalla prevalenza dell'infezione stimata. La media del campione per gruppo è stato di 7 campioni di siero. In questo studio, 200 allevamenti di suini sono stati analizzati in Spagna, Ungheria, Polonia, Repubblica Ceca, Slovacchia, Italia e Danimarca. La sierologia è stata realizzata in ELISA (CIVTESTsuis PRRS / ES Laboratorios HIPRA, Amer, España) seguendo le istruzioni del produttore. Da ogni azienda controllata sono stati presi i dati produttivi, il programma vaccinale e lo stato di salute.

RISULTATI

Dopo aver testato 200 allevamenti, tenendo presenti i segni clinici ed il sieroprofilo, potremmo determinare 3 modelli di infezione che ci permettono di definire 3 diversi stati epidemiologici di PRRS: 1.C non clinicamente stabile e sierologicamente non stabile, (42/200); 2.Clinicamente stabile e sierologicamente non stabile, (112/200); 3.Clinicamente stabile e sierologicamente stabile, (36/200). Va' sottolineato che 10 aziende non siamo riusciti a classificarle in nessun modello predeterminato.

DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Al fine di stabilire questi 3 stati abbiamo studiato i risultati sierologici osservati nei diversi gruppi di scrofe, e specificatamente i risultati sierologici da 7 settimane di età dei suinetti . Abbiamo stabilito le 7 settimane di età come un punto di svolta, perché l'immunità passiva non può raggiungere alti livelli IRPC a 7 settimane di età (Cho et al. 2006), quindi se osserviamo titoli alti a questa età si può sospettare che i suinetti sono stati svezzati in viremia, e per questo motivo siamo in grado di sospettare che ci sia circolazione del virus selvaggio in sala parto, da ciò possiamo dedurre che le scrofe non sono stabilizzate. Nelle aziende in cui sono stati vaccinati i suinetti, non abbiamo potuto determinare alcun modello, perché la vaccinazione maschera la infezione dinamica dei suinetti, quindi e' impossibile classificarli. Tuttavia la vaccinazione nelle scrofe non interferisce in questa classificazione, poiché si osserva che i livelli di anticorpi ob ottenuti grazie alla vaccinazione non sono superiori a 100. D'altra parte i livelli di anticorpi indotta dopo l'infezione recente di un virus selvaggio sono superiori a 100. Abbiamo osservato che l'evoluzione dell'infezione PRRS nelle aziende vanno secondo questi 3 indicatori , passando da un stato all'altro in 6 / 12 mesi.

Abbiamo potuto osservare quantità simili di aziende classificate in ogni stato. Tuttavia abbiamo osservato che la maggior parte degli allevamenti in cui almeno si sono vaccinate le scrofe, si trova nel secondo stadio.

Di conseguenza, secondo questa classificazione, dopo l'interpretazione del sieroprofilo risulta che il suiatra e' in grado di monitorare e prendere le decisioni appropriate in funzione dello stato epidemiologico di ogni allevamento, l'impostazione dei trattamenti adatti per il controllo della sindrome PRRS.

Riferimenti

Meulenberg JJM PRRSV, il virus. *Veterinary Research* 31, 11-21 (2000).

Cho JG , Dee SA . Riproduttiva dei suini e virus sindrome respiratoria. Theriogenology. ago 2006, 66 (3) :655-62. Epub maggio 2006 24.

POLMONITE ENZOOTICA: AGGIORNAMENTO SUL MONITORAGGIO DELLE LESIONI BRONCOPOLMONARI IN SUINI MACELLATI

UPDATE ON THE MONITORING OF ENZOOTIC PNEUMONIA LIKE LESIONS IN ITALIAN SLAUGHTERED PIGS

LUPPI A., BONILAURI P., MERIALDI G., RUGNA G., DOTTORI M.

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

Parole chiave: malattia respiratoria, macello, polmonite enzootica

Key words: respiratory disease, slaughterhouse, enzootic pneumonia

RIASSUNTO

Nel periodo Gennaio 2004 e Dicembre 2012 21554 suini di 196 partite appartenenti ad allevamenti del nord Italia sono stati sottoposti a score polmonare impiegando il metodo Madec. I dati ottenuti da questa attività sono stati suddivisi in due gruppi: 2004-2009 (6380 suini appartenenti a 60 partite) e 2010-2012 (15174 suini appartenenti a 136 partite). L'applicazione della griglia Madec nel periodo 2004-2009 ha evidenziato la presenza di lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica in 3249 casi (50.9%). Il valore medio ottenuto considerando tutti i polmoni sottoposti a punteggiatura nel periodo considerato è stato di 1,4 con valore minimo e massimo tra tutte le partite punteggiate rispettivamente di 0,43 e 4,44. Eseguendo la stessa valutazione sui polmoni di 15174 suini sottoposti a score polmonare nel periodo 2010-2012, lesioni riferibili a polmonite enzootica sono state registrate in 6976 animali (45,9%) e il valore medio globale è risultato essere di 1,07 con valori minimi e massimi rispettivamente di 0,16 e 3,11. Il valore medio ottenuto nel periodo 2004-2009 è risultato essere significativamente più alto (test Anova $p < 0,01$) rispetto a quello ottenuto nel periodo 2010-2012. Questi dati evidenziano una diminuzione dell'incidenza e della gravità delle lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica al macello in un periodo di circa dieci anni e di riflesso un miglioramento nel controllo della malattia negli allevamenti. I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2010-2012 sono stati inoltre organizzati in 4 categorie o quartili: < 0,66 quarto migliore; 0,66 – 0,98 quarto intermedio migliore; 0,98 – 1,35 quarto intermedio peggiore; > 1,35 quarto peggiore. Questa suddivisione permetterà di classificare una determinata partita sulla base del proprio valore medio rispetto ad una popolazione di suini rappresentativa di una determinata area geografica, come quella oggetto dello studio.

SUMMARY

From January 2004 to December 2012, lungs from 21554 pigs (160 kg slaughter weight, aged 9-10 months) belonging to Italian farms, were evaluated using the Madec grid. The data obtained were collected into two groups: 2004-2009 (6380 pigs belonging to 60 batches) and 2010-2012 (15174 pigs belonging to 136 batches). In the period 2004-2009 bronchopneumonic lesions suggestive of enzootic pneumonia (EP like) were detected in 3249 lungs (50.9%) and the average value for all batches was 1.4 ranging from 0.43 and 4.44 while, in the period 2010-2012 EP-like lesions were detected in 6976 lungs (45.9%). In this second period the EP-like lesion average value for all batches was 1.07, ranging from 0.16 and 3.11 among the 136 batches. The application of Madec's grid in the two considered

periods confirms the high incidence of these lesions in Italian swine herds. However, the EP-like average value (1.07) of batches scored in 2010-2012 was significantly lower if compared to that (1.4) obtained in the survey carried out in 2004-2009 (one way Anova test $p < 0.01$). These values are definitely lower than those reported by Ostanello et al. (2006) based on lungs from 10041 pigs scored in the period 2003-2004, in which the overall Ep-like average value was 2.11. Overall, the results of the survey reported in this paper shows an improvement of the control of EP in Italy.

The EP-like lesion average values, obtained for each batch in the period 2010-2012, were organised in four categories (quartiles): best quarter < 0.66 ; intermediate best quarter from 0.66 to 0.98; intermediate worst quarter from 0.98 to 1.35 and worst quarter > 1.35 . The distribution in categories of EP average values can be used to rank a batch in comparison to the whole population.

INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) costituisce uno dei principali problemi sanitari dell'allevamento suino mondiale ed è il risultato dell'interazione di agenti patogeni infettivi (virus, micoplasmi e batteri), condizioni ambientali e fattori legati all'ospite. Le broncopolmoniti osservabili nel suino, descritte generalmente con il termine anglosassone di "enzootic pneumonia like lesions" e caratterizzate da consolidamento polmonare ventro-craniale, sono provocate principalmente dall'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* complicata da patogeni batterici di irruzione secondaria (nella maggior parte dei casi *Pasteurella multocida*) (Sørensen V. et al., 2006).

La sorveglianza della malattia respiratoria nel suino tramite lo score polmonare al macello è frequentemente utilizzata per stimare l'incidenza delle lesioni pleuriche e di quelle broncopolmonari. I risultati di studi di monitoraggio delle lesioni polmonari al macello, condotti in diversi paesi Europei, hanno evidenziato elevate percentuali di lesioni broncopolmonari nei suini macellati: 46,4% in Italia (Merialdi et al., 2012), 23,8% in Belgio (Meyns et al., 2010) e 55,7% in Spagna (Fraile et al., 2009). Il macello costituisce quindi la sede dove poter eseguire valutazioni di tipo sanitario sugli animali macellati. In questa sede infatti è possibile raccogliere importanti informazioni che sono il risultato dell'interazione tra l'animale, l'ambiente e gli agenti patogeni durante l'intero ciclo produttivo. La valutazione delle lesioni broncopolmonari al macello si basa sull'applicazione di sistemi o griglie di punteggiatura standardizzate da diversi autori (Madec e Kobisch, 1982; Morrison et al., 1985; Christensen et al., 1999) e successivamente applicate e modificate. Il metodo scelto per la punteggiatura delle lesioni polmonari al macello dovrebbe rispondere a tre fondamentali requisiti: 1) essere adeguato alla velocità della catena di macellazione (ad es. 300-400 suini/ora); 2) facilmente riproducibile e ripetibile; 3) fornire un risultato facilmente interpretabile e comparabile.

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. Condurre uno studio comparativo tra le osservazioni condotte al macello nel periodo 2004-2009 con quelle ottenute nel triennio 2010-2012.
2. Fornire informazioni ed elementi utili alla corretta interpretazione ed al confronto dei risultati ottenuti dalla valutazione delle lesioni broncopolmonari al macello con l'impiego della griglia Madec.

MATERIALI E METODI

Tra Gennaio 2004 e Dicembre 2012 21554 suini di 196 partite appartenenti ad allevamenti del nord Italia sono stati sottoposti a score polmonare impiegando il metodo Madec modificato

(Dottori et al. 2004). I dati ottenuti da questa attività sono stati suddivisi in due gruppi: 2004-2009 (6380 suini appartenenti a 60 partite) e 2010-2012 (15174 suini appartenenti a 136 partite). Gli allevamenti da cui provengono le partite sopraccitate sono situati in Pianura Padana e finalizzati alla produzione del suino pesante (peso di macellazione 160 kg). Nello studio sono state incluse al massimo due partite per ogni allevamento di cui sono stati valutati i polmoni appartenenti a 100 animali/partita. Alla catena di macellazione le lesioni riferibili a polmonite enzootica sono state sottoposte a valutazione utilizzando il metodo Madec modificato (tabella 1 e figura 1).

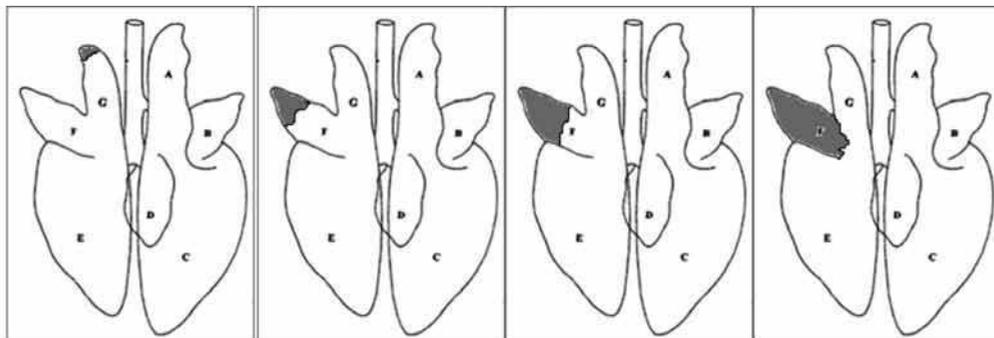
La Tabella 1 illustra i principi di valutazione su cui si basa la griglia Madec da noi applicata, con l'indicazione del punteggio assegnato in relazione alla tipologia della lesione.

Tabella 1: griglia Madec modificata (Dottori et al. 2004) per la valutazione delle lesioni riferibili a polmonite enzootica

Table 1: the Madec's grid for Enzootic pneumonia like lesions evaluation, slightly modified (Dottori et al. 2004)

Punteggio assegnabile ad ogni lobo	Estensione delle lesioni
0	Assenza
1	Da 0 a 25% del lobo
2	Da 26 a 50% del lobo
3	Da 51 a 75% del lobo
4	Da 76 a 100% del lobo

Figura 1: esempi di distribuzione delle lesioni in relazione ai quattro punteggi assegnabili
Figure 1: examples of the lesions distribution related to the lobe scores



Schema polmoni di suino: vista dorsale. A. lobo apicale dx; B. lobo cardiaca dx; C. lobo diaframmatico dx; D. lobo azigos; E. lobo diaframmatico sx; F. lobo cardiaco sx; G. lobo apicale sx;

I dati ottenuti dall'applicazione della griglia Madec su una partita di polmoni di suino permette di calcolare il valore medio della partita (somma dei singoli score polmonari/ numero di polmoni valutati) che descrive il grado generale delle lesioni riferibili a polmonite

enzootica della partita stessa.

Il valore medio di ogni partita punteggiata è stato utilizzato per calcolare il valore medio globale per ognuno dei due periodi oggetto dello studio (2004-2009 e 2010-2012), considerando all'interno di questi tutti i polmoni punteggiati come facenti parte di un'unica partita. I due valori medi globali così ottenuti sono stati confrontati utilizzando il test ANOVA. I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2010-2012 sono stati inoltre organizzati in 4 categorie o quartili.

RISULTATI

L'applicazione della griglia Madec nel periodo 2004-2009 su polmoni di 6380 suini macellati ha evidenziato la presenza di lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica in 3249 casi (50,9%). Il valore medio ottenuto considerando tutti i polmoni sottoposti a punteggiatura nel periodo considerato è stato di 1,4 con valore minimo e massimo tra tutte le partite punteggiate rispettivamente di 0,43 e 4,44. Eseguendo la stessa valutazione sui polmoni di 15174 suini sottoposti a score polmonare nel periodo 2010-2012, le lesioni riferibili a polmonite enzootica sono state registrate in 6976 animali (45,9%) e il valore medio globale è risultato essere di 1,07 con valori minimi e massimi rispettivamente di 0,16 e 3,11. Il valore medio ottenuto nel periodo 2004-2009 è risultato essere significativamente più alto (test Anova $p < 0,01$) rispetto a quello ottenuto nel periodo 2010-2012.

I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2010-2012 sono stati distribuiti in quattro classi (figura 2):

- $< 0,66$ quarto migliore
- $0,66 - 0,98$ quarto intermedio migliore
- $0,98 - 1,35$ quarto intermedio peggiore
- $> 1,35$ quarto peggiore

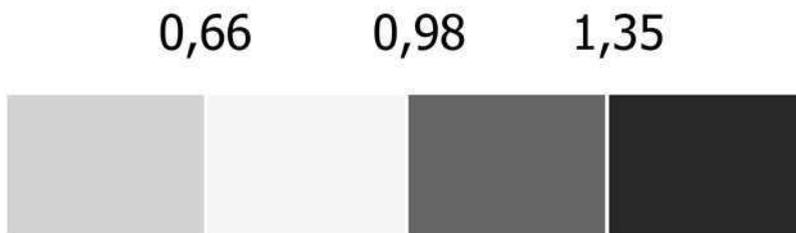


Figura 2: Distribuzione delle medie dei punteggi polmonari (polmoni appartenenti a 15174 punteggiati nel periodo 2010-2012) in quattro quartili: valore medio $< 0,66$ (quarto migliore delle aziende campionate); valore medio tra 0,66 e 0,98 (quarto intermedio migliore delle aziende campionate); valore medio tra 0,98 e 1,35 (quarto intermedio peggiore delle aziende campionate); valore medio $> 1,35$ (quarto peggiore delle aziende campionate)

Figure 1: Distribution of average values in four classes: $< 0,66$ (best quarter); from 0,66 to 0,98 (intermediate best quarter); from 0,98 to 1,35 (intermediate worst quarter); $> 1,35$ (worst quarter).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati ottenuti nel presente studio forniscono una panoramica altamente significativa

sulla prevalenza delle lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica in Italia. Il primo dato che si evince dal presente lavoro e che merita di essere discusso riguarda la comparazione dei risultati tra le osservazioni condotte al macello nel periodo 2004-2009 con quelle ottenute nel triennio 2010-2012. Gli animali presentanti lesioni riferibili a polmonite enzootica sono risultati essere pari al 50,9% nel periodo 2004-2009 e al 45,9% nel periodo 2010-2012. I dati ottenuti, in particolare in quest'ultimo periodo, appaiono sovrapponibili a quelli riportati nel 2012 in uno studio di Merialdi et al. in Italia (periodo di riferimento: 2008), in cui la prevalenza di lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica si attestava intorno al 46%. Le prevalenze ottenute sia nel primo, sia nel secondo periodo, appaiono nettamente inferiori a quella riportata da Ostanello et al., nel 2007 (periodo di riferimento: 2004-2005), pari al 59,6%. Confrontando i nostri risultati con i dati di prevalenza ottenuti in studi condotti in altri paesi Europei, si osserva come questi siano circa il doppio rispetto a quello descritto in Belgio (23,8%) da Meyns et al. nel 2010 e inferiore a quello ottenuto in Spagna (55,7%) da Fraile et al. nel 2009. I valori medi ottenuti da tutti i polmoni esaminati nei due periodi considerati, 2004-2009 e 2010-2012 sono stati rispettivamente di 1,4 e 1,07. Questa differenza è risultata statisticamente significativa. Entrambi i risultati si sono dimostrati nettamente inferiori al valore di 2,11 ottenuto in uno studio su 10041 polmoni sottoposti a punteggiatura al macello negli anni 2003-2004 (Ostanello et al., 2006). Questi dati, congiuntamente a quelli di prevalenza sopra riportati, evidenziano una diminuzione dell'incidenza delle lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica al macello in un periodo di circa dieci anni e di riflesso un miglioramento nel controllo della malattia negli allevamenti.

Il secondo risultato che merita un'attenta riflessione riguarda la possibilità, attraverso l'analisi della distribuzione dei punteggi medi ottenuti nel periodo 2010-2012 sulla popolazione oggetto dello studio, di eseguire una suddivisione delle partite in 4 classi o quartili. Questa suddivisione permetterà di classificare una determinata partita sulla base del proprio valore medio, rispetto ad una popolazione di suini rappresentativa di una determinata area geografica, come quella oggetto dello studio. In questo modo sarà possibile posizionare una partita sottoposta a monitoraggio al macello, nel quarto migliore, intermedio migliore, intermedio peggiore o nel quarto peggiore delle partite campionate dal 2010 ad oggi.

BIBLIOGRAFIA

1. Christensen, G., Enoe, C. (1999). The prevalence of pneumonia, pleuritis, pericarditis and liver spots in Danish slaughter pigs in 1998, including comparison with 1994. *Danish Veterinary Journal* 82, 1006–1015.
2. Dottori M., Gurmara C., Leotti G., Ostanello F., Sala V. 2004. Impiego del punteggio polmonare al macello nella valutazione della malattia respiratoria da *M. hyopneumoniae* sul suino pesante. *Atti XXVIII Corso in Patologia Suina, Brescia* 2004, pp143-156.
3. Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarias, M., Segalés, J. (2010). Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter pigs. *The Veterinary Journal* 184, 326–333.
4. Madec, F., Kobisch, M. (1982). Bilan lesionnel de poumons de porcs charcutiers a l'abattoir. *Journée Recherche Porcine* 14, 405–412.
5. Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F. (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. *Veterinary Microbiology* 126, 297–309.

6. Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. (2012). 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*, 193, 234-239.
7. Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Heasebrouk, F., Maes, D. (2011). A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *The Veterinary Journal* 187, 388–392.
8. Morrison R.B., Pijoan C., Leman A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. *Pig News and Information* 7, 23-31.
9. Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Sala V. (2006). Utilizzo del punteggio polmonare (Lung Score) nei suini Italiani: validazione del metodo, valutazione della prevalenza e dei fattori di rischio associati all'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Large Animal Review*, 2, 13-21.
10. Ostanello, F., Dottori, M., Gusmara, C., Leotti, G., Sala, V. (2007). Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *Journal of Veterinary Medicine* 5, 70–75.
11. Sørensen V. (2006). “Disease of the respiratory system” in: *Diseases of Swine*, 9th ed., 149-177.

PREMIO GUADAGNINI

EFFETTO DEL SEX-SORTING SU ALCUNI PARAMETRI FUNZIONALI DEGLI SPERMATOZOI DI VERRO

EFFECT OF SEX-SORTING ON SOME FUNCTIONAL PARAMETERS OF BOAR SPERMATOZOA

Bucci D.¹, Galeati G.¹, Tamanini C.¹, Vallorani C.¹, Rodriguez-Gil J. E.², Spinaci M.¹

¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna;*

²*Departament de Medicina i Cirurgia Animal, Universitat AUB, Barcelona, Spain.*

Parole chiave: spermatozoi, verro, sex-sorting, capacitazione

Keywords: spermatozoa, boar sex-sorting, capacitation

Riassunto

Il sessaggio degli spermatozoi permette la predeterminazione del sesso del conceptus; tale tecnica presenta dei limiti dovuti alla bassa fertilità del seme dopo il processo. Lo scopo di questo lavoro è stato di analizzare presunte modificazioni simil-capacitative, che possono determinare una riduzione della qualità del seme in spermatozoi sessati di verro. I parametri valutati sono stati i pattern della colorazione CTC, l'organizzazione del citoscheletro di actina e la determinazione dei pattern di fosforilazione dei residui di tirosina; gli ultimi due parametri sono stati valutati sia con immunofluorescenza che con western blotting. Gli spermatozoi sessati (Sort) sono stati confrontati con spermatozoi "freschi" (F), capacitati (Cap) e dopo reazione acrosomiale (RA). Gli spermatozoi Sort hanno mostrato una distribuzione dei pattern CTC simile a quella dei Cap, così come la localizzazione dell'actina; l'espressione dell'actina, indagata con western blotting, non ha mostrato differenze. I pattern di fosforilazione dei residui di tirosina sono risultati inalterati negli spermatozoi Sort confrontati con gli F; inoltre, l'analisi con western blotting ha evidenziato alcune differenze qualitative tra tutti i trattamenti. I nostri risultati dimostrano che non tutte le modificazioni dei parametri studiati dopo sessaggio sono riconducibili alla capacitazione; in particolare si notano cambiamenti forti nel parametro più indicativo di modificazioni della membrana plasmatica.

Abstract

Sperm sorting technology permits sex pre-selection, but it presents some troubles, due to low fertility after the process.

The main aim of this work was to analyze the putative existence of capacitation-like changes in boar sperm subjected to sex sorting that could lead to a detriment of semen quality. The parameters used were CTC staining patterns, actin cytoskeleton organization and tyrosine phosphorylation patterns; the last two were determined by both western blotting and immunofluorescence. Sex sorted (Sort) spermatozoa were compared with fresh (F), capacitated (Cap) and acrosome reacted (AR) sperm. Sort sperm showed a CTC staining pattern similar to that observed in Cap, as well as actin pattern distribution. However, actin expression analysis through western blot did not show any change.

The tyrosine phosphorylation pattern was practically unaltered after the sex sorting process; additionally, western blotting analysis evidenced some differences in the expression of protein tyrosine phosphorylation among the different groups.

Our results indicate that not all the sex-sorted related modification of the studied parameters were similar to that occurred after “in vitro” capacitation, thus suggesting that sex sorting-induced alterations of sperm function and structure are not necessarily indicating the achievement of the capacitated status.

Introduzione

Il processo di sessaggio degli spermatozoi induce svariati danni strutturali e funzionali che possono diminuire la possibilità di conservazione e la fertilità, in particolar modo nel maiale, mentre altre specie sembrano meno sensibili (De Graaf et al., 2009; Vazquez et al., 2009; Rath et al., 2009). Queste modificazioni sono imputabili a una serie di fattori legati al processo di sessaggio (Rath et al., 2009; Maxwell et al., 1997; Maxwell e Johnson, 1999; Johnson, 2000). Inoltre alcuni studi hanno dimostrato che il sessaggio induce cambiamenti simil-capacitativi negli spermatozoi, particolarmente evidenti nella distribuzione dei pattern del saggio CTC (Maxwell et al., 1997; Maxwell e Johnson, 1997; Maxwell et al., 1998).

La capacitazione è un processo cui gli spermatozoi vanno incontro nel tratto genitale femminile, che consiste nell’acquisizione della capacità di legarsi ad un oocita, penetrarne la zona pellucida e fertilizzarlo (Yanagimachi, 2008). Tra le modificazioni che la cellula subisce vanno ricordate: l’attivazione del pattern iperattivato della motilità (Yanagimachi, 2008), cambiamenti nella fluidità di membrana (Flesch e Gadella., 2000; Gadella, 2008), entrata di ioni bicarbonato (Harrison e Gadella., 2005) e calcio, (Flesch e Gadella., 2000), attivazione delle protein chinasi (Flesch e Gadella, 2000), fosforilazione dei residui di tirosina di alcune proteine (Flesch e Gadella, 2000; Urner e Sakkas, 2003; Vadnais et al., 2007) e riorganizzazione del citoscheletro di actina (Breitbart et al., 2005). La capacitazione “in vitro” (CIV) e la reazione acrosomiale (RAIV) necessitano di diverse sostanze stimolanti a seconda della specie: nel verro il bicarbonato e la BSA (bovine serum albumine) sono importanti induttori della capacitazione (Harrison e Gadella, 2005). La RAIV è stata indotta sia con zone pellucide solubilizzate che con l’aggiunta nel medium di incubazione del calcio ionoforo A23187 (Berger et al., 1989; Byrd, 1981).

La fosforilazione dei residui di tirosina è ritenuta uno degli eventi più tardivi del processo capacitativo e varie proteine della coda e della testa dello spermatozoo sono fosforilate nei residui di tirosina in presenza di condizioni capacitative o in media pro-capacitanti (Urner e Sakkas, 2003; Bailey et al., 2005; Grasa et al., 2009). Inoltre, il rimodellamento del citoscheletro di actina è uno degli eventi più evidenti durante la capacitazione e la reazione acrosomiale (Breitbart et al., 2005; Castellani-Ceresa et al., 1992, 1993; Brener et al., 2003).

Lo scopo del presente studio è stato di determinare se il processo di sessaggio degli spermatozoi di verro induca dei cambiamenti nell’organizzazione del citoscheletro, nella fosforilazione delle proteine nei residui di tirosina e nella colorazione CTC, che possano essere riconducibili alle modificazioni osservate in seguito a CIV o RAIV.

Materiali E Metodi

Tutti i reagenti utilizzati sono stati ottenuti dalla Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA), tranne laddove diversamente specificato.

Il seme è stato prelevato da tre verri sessualmente maturi (frazione ricca) di provata fertilità mediante la tecnica della mano guantata; dopo la raccolta il seme è stato diluito con il medium specifico (Androhep™) per essere trasportato in laboratorio entro un’ora

dalla raccolta. Per ridurre l'effetto individuale i campioni sono stati mescolati in pool. Aliquote di seme diluito sono state chiamate "Fresco".

La concentrazione dei campioni è stata valutata mediante una camera emocitometrica (Camera Thoma, Merck, Leuven, Belgio).

Il seme è stato lavato in medium di Brackett & Oliphant (Brackett e Oliphant, 1975) mediante due successive centrifugazioni a 800 x g per 3 minuti. Il pellet così ottenuto è stato diluito in medium per IVF, costituito da medium di Brackett & Oliphant, con 12% di siero fetale bovino (FCS-Gibco, Invitrogen, Italia). Gli spermatozoi (ad una concentrazione di 100×10^6 cellule/mL) sono stati incubati a 39°C in atmosfera modificata con 5% CO₂ per 4 ore per indurre la capacitazione (CIV); la reazione acrosomiale è stata indotta con l'aggiunta di A23187 per 20 min a una concentrazione finale di 10 mM (RAIV).

La vitalità del seme è stata valutata mediante colorazione con SYBR Green 14 Ioduro di Propidio come descritto da Spinaci et al. (2005).

Per determinare il grado di capacitazione e la reazione acrosomiale gli spermatozoi sono stati testati con la colorazione con clorotetraciclina (CTC), un colorante che ha affinità per i siti leganti il calcio (Mattioli et al., 1996; Maxwell e Johnson, 1997). Tre diversi pattern di colorazione sono stati distinti, come già descritto (Mattioli et al., 1996; Maxwell e Johnson, 1997): F) fluorescenza equamente distribuita in tutta la testa, tipica degli spermatozoi freschi; B) fluorescenza circoscritta alla zona acrosomiale e assenza nella zona post acrosomiale, tipica degli spermatozoi capacitati; AR) fluorescenza circoscritta alla linea/banda equatoriale, tipica delle cellule dopo reazione acrosomiale.

Western Blotting

Pellets di spermatozoi (100×10^6 spz) sono stati sonicati in 100 µL di buffer di omogeneizzazione (50 mM Tris-HCl buffer pH7,4 contenente 1mM EDTA, 10 mM EGTA, 25 mM DTT, 1,5% (w/v) Triton X-100, 1 mM PMSF, antiprotease cocktail). I campioni sono stati successivamente centrifugati a 12000 x g per 15 min a 4°C ed i surnatanti così ottenuti sono stati conservati per la determinazione del contenuto di proteine. Per quanto riguarda l'actina, è stata eseguita una precipitazione in acetone, come descritto da Flores et al. (2010). Per determinare la quantità di proteine nel campione è stato utilizzato il metodo Bradford (Bradford, 1976) utilizzando un kit commerciale (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA); i campioni sono poi stati conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

L'elettroforesi è stata eseguita utilizzando un sistema Invitrogen Xcell Surelock, gel al 10% di Bis-Tris glicina e come tampone per la corsa è stato utilizzato il MOPS; in ogni pozzetto è stato caricato un volume di campione equivalente a 20 µg di proteina.

In seguito si è effettuato il trasferimento su membrana di nitrocellulosa con il sistema per blotting Invitrogen Xcell Surelock Blot Module con tampone di trasferimento a pH 7,2.

Le membrane sono state quindi lavate velocemente in PBS e i legami proteici non-specifici sono stati bloccati con una soluzione costituita da PBS-T20 (PBS 0,1% Tween 20) con il 2,5% di BSA per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente le membrane sono state incubate overnight con l'anticorpo monoclonale anti tirosina-fosforilata (Upstate Millipore, Watford, UK), diluito 1:10000 ed anti actina (Sigma) diluito 1:500 in TBS-T20 (Tris-buffered solution, (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 500 mM NaCl) 0,1% Tween 20) a 4°C. Dopo diversi lavaggi con il PBS-T20 le membrane sono state incubate a temperatura ambiente con anticorpi secondari biotina-coniugati anti-mouse diluito 1:10000 (Biofix Laboratories, Owing Mills, MD, USA) per fosfo-tirosina ed anti-rabbit diluito 1:20000 (Stressgen Bioreagents, Ann Arbor, MI, USA) per actina per 1 ora.

In seguito ad altri lavaggi le membrane sono state incubate con anticorpi anti-biotina

diluiti 1:1000, HRP (horseradish peroxidase)-coniugati (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA). I campioni di controllo sono stati trattati allo stesso modo con l'omissione dell'anticorpo primario. I western blots sono stati rivelati utilizzando il kit Super signal west pico (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) come da istruzioni della casa produttrice.

Le membrane sono state in seguito ritestate per la β -tubulina per verificare che fosse stata caricata la stessa quantità di proteina.

Immunofluorescenza

Tutte le procedure sono state condotte a temperatura ambiente, salvo diversa indicazione. Campioni di spermatozoi sono stati posti su un vetrino precedentemente trattato con poli L-lisina, fissati con metanolo a -20°C per 5 min e successivamente con acetone per 30 sec. I vetrini sono poi stati lavati in PBS, lasciati asciugare ed incubati con blocking 10% (v/v) FCS (foetal calf serum) in PBS per 30 min. In seguito i vetrini sono stati incubati overnight a 4°C con gli anticorpi anti fosfotirosina ed anti actina diluiti in blocking. Dopo vari lavaggi i campioni sono stati incubati 1 ora al buio con gli anticorpi secondari FITC-coniugati rispettivi (1:800 anti mouse per fosfotirosina, 1:2200 anti rabbit per actina).

Per controllare lo stato degli acrosomi i vetrini sono stati successivamente lavati in PBS, incubati 15 min al buio con PNA (agglutinina dell'arachide) TRITC-coniugata (10 mM) e lavati. Infine i vetri sono stati incubati per 5 min con Hoechst 33342 al buio per contro colorare i nuclei e montati con medium "anti-fading" Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). I campioni di controllo sono stati trattati allo stesso modo con l'omissione degli anticorpi primari. Le immagini sono state ottenute mediante un microscopio ad epifluorescenza Nikon.

Ogni campione è stato analizzando contando almeno 200 cellule per definire i diversi pattern di positività e delineare la loro distribuzione fra i vari gruppi.

Analisi Statistica

Per ogni campione sono stati valutati almeno 200 spermatozoi; ogni esperimento è stato ripetuto 5 volte. I risultati sono espressi come media \pm errore standard.

I dati sono stati sottoposti a test di Kolmogorof-Smirnoff per determinare la loro distribuzione che è risultata essere normale. In seguito è stata eseguita una ANOVA con successivo post-hoc test di Bonferroni per determinare le differenze tra gruppi. Il valore di significatività è stato fissato a 0,05. Il software utilizzato è stato Macintosh SPSS 11.

Risultati

La frazione ricca degli eiaculati aveva una concentrazione di $37,3 \pm 6,4 \times 10^7$ sperm/mL; la vitalità degli spermatozoi freschi è risultata pari a $91,3 \pm 2\%$.

La variazione dei pattern di CTC (F, B, AR descritti precedentemente) in conseguenza dei diversi trattamenti è riportata nella tabella 1.

Risulta evidente un aumento della percentuale di spermatozoi con pattern B dopo CIV e RAIIV, mentre un incremento chiaro del pattern AR è evidente solo nel gruppo RAIIV. Il gruppo Sortati evidenzia un aumento della percentuale delle cellule che esprimono il pattern B con una conseguente diminuzione del pattern F; questo risultato è simile a quanto osservato dopo CIV.

Tabella 1. Pattern della colorazione CTC in spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV e RAIV e Sortati.

CTC pattern	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
F (%)	92,6±1,3 ^a	67,7± 2,9 ^b	7,3±1,3 ^c	68,6±1,3 ^b
B (%)	5,3±1,3 ^a	24,3±2,6 ^b	46,7±7 ^c	25,6±1,1 ^b
AR (%)	2,1±1,7 ^a	8,0±1,5 ^a	46,0±7.6 ^b	5,8±0,3 ^a

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

Caratterizzazione Dei Pattern Di Actina E Fosfotirosina

Actina

I tre seguenti pattern sono stati caratterizzati con l'immunofluorescenza:

- A) positività a livello acrosomiale e nella linea/banda equatoriale;
- B) positività dell'acrosoma e della banda post-equatoriale accompagnata da un aumento della positività della coda;
- C) positività della banda post-equatoriale e della coda.

La distribuzione dei diversi pattern nei vari trattamenti è riportata nella tabella 2.

Un cambio nella distribuzione delle subpopolazioni di cellule che esprimono i diversi pattern di actina è stato osservato dopo CIV e RAIV. Questo cambio comprende un aumento del pattern B dopo CIV ed un incremento del pattern C dopo RAIV. Negli spermatozoi Sessati si nota una differenza significativa per il pattern A, quando comparati con i Freschi, mentre gli altri pattern non differiscono.

Tabella 2. Distribuzione dei pattern di actina negli spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV, RAIV e Sortati.

Pattern Actina	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
A (%)	91,8±0,7 ^a	21,3±6,3 ^b	5,1±0,8 ^b	61,4±8,6 ^c
B (%)	5,8±0,5 ^a	70,4±5,1 ^b	24,5±2,3 ^a	28,9±8,6 ^a
C (%)	2,4± 0,2 ^a	8,3±1,2 ^a	70,5±3,8 ^b	5,8±1,0 ^a

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

Fosoforilazione Dei Residui Di Tirosina

Gli spermatozoi hanno mostrato i seguenti pattern di positività:

- A) positività diffusa nell'acrosoma e una positività triangolare sub segmento equatoriale;
- B) la positività a livello equatoriale è triangolare o diffusa; appare una positività nella parte principale e finale della coda; è conservata la positività acrosomiale;
- C) positività del segmento equatoriale e della coda.

Nella tabella 3 si nota una prevalenza del pattern A nelle cellule Fresche, mentre i pattern B e C prevalgono rispettivamente nelle cellule dopo CIV e RAIV. Gli spermatozoi Sortati presentano una distribuzione dei pattern simile a quella dei Freschi, con un aumento significativo del pattern C.

Tabella 3. Distribuzione dei pattern di tirosina fosforilata negli spermatozoi di verro Freschi, dopo CIV, RAIV e Sortati.

Pattern tirosina	Freschi	CIV	RAIV	Sortati
A (%)	88,2±3,7 ^a	19,4±5,4 ^b	2,9±0,7 ^c	80,3±3,3 ^a
B (%)	9,2±3,1 ^a	68,9±5,8 ^b	17,8±2,7 ^a	8,3±3,3 ^a
C (%)	2,6±1,0 ^a	11,7±0,4 ^b	79,6±2,1 ^c	11,5±2,8 ^b

I valori sono espressi come media ± S.E.M di almeno 5 replicati. Le differenze statisticamente significative sono indicate con lettere in apice per riga.

Western blotting

Per quanto riguarda l'actina è stata osservata una banda di 42 KDa e nessuna differenza è risultata significativa a seguito dei trattamenti.

Per quanto riguarda la fosforilazione dei residui di tirosina, è stata osservata una differenza qualitativa tra spermatozoi Freschi, CIV, RAIV e Sortati.

In queste condizioni sperimentali non si sono evidenziate delle differenze per quanto riguarda la p32, che è considerata un marker di capacitazione, anche se generalmente nei CIV e RAIV si nota un lieve incremento. Nelle cellule RAIV è evidente a 25 kDa una banda molto forte, mentre le altre bande sono più deboli. Nei lisati degli spermatozoi Sortati sono evidenti due bande distinte a 23 e 25 KDa, con l'ultima più marcata.

Discussione

Lo scopo di questo lavoro era di verificare se il processo di sessaggio degli spermatozoi induce cambiamenti simil-capacitativi negli spermatozoi di maiale.

Gli spermatozoi sessati di verro hanno evidenziato una distribuzione dei pattern del CTC simile a quella delle cellule dopo CIV; questi risultati sono concordi con altri studi (Maxwell e Johnson, 1997). Quegli Autori hanno ipotizzato che il cambiamento sia dovuto alla diluizione e alla successiva centrifugazione degli spermatozoi (quest'ultimo considerato come un passaggio pre-capacitante), ma non sono convinti che l'entità dei cambiamenti possa essere definita capacitante in senso stretto, perché la capacitazione in vitro degli spermatozoi del maiale necessita del bicarbonato nel medium di incubazione (Maxwell e Johnson, 1997).

L'induzione di cambiamenti simil-capacitativi da parte delle tecnologie applicate alla riproduzione animale come il sessaggio e la crioconservazione è un campo aperto: finora gli spermatozoi sessati sono stati analizzati solo con la tecnica del CTC e questo è il primo studio che applica nuovi parametri.

Il rimodellamento del citoscheletro è stato descritto precedentemente da altri Autori (Brener et al., 2003) in spermatozoi di toro, topo, uomo ed ariete con la colorazione con falloidina FITC-coniugata. I suddetti autori hanno descritto una organizzazione dell'actina in filamenti (F actina) durante la capacitazione ed una successiva depolimerizzazione alla fine

della reazione acrosomiale. Due articoli di Castellani-Ceresa e collaboratori (1992, 1993) hanno dimostrato il possibile ruolo dell'actina nell'acquisizione della capacità fecondante da parte degli spermatozoi di verro. I nostri dati sono simili a quanto riportato da Colas et al. (2009) riguardo alla distribuzione dell'actina in spermatozoi Freschi e dopo CIV e RAIV. Negli spermatozoi Sessati il pattern A prevale sugli altri due, ma è statisticamente inferiore a quanto osservato nei Freschi; si può perciò ritenere che il processo di sessaggio determini un cambiamento, che però è di minore intensità di quello prodotto dal CIV e dalla RAIV. Lo stesso andamento è stato descritto da Flores et al. (2010) in spermatozoi di verro congelati e scongelati messi a confronto con cellule appena eiaculate. Si può quindi suggerire che l'organizzazione dell'actina negli spermatozoi di verro sia influenzata dalle tecnologie applicate alla riproduzione.

L'altro parametro che abbiamo studiato è la modificazione dello stato di fosforilazione dei residui di tirosina delle proteine.

I diversi pattern che abbiamo descritto con l'immunofluorescenza sono simili a quanto già riportato nel verro (Jones et al. 2008; Tardif et al., 2001). L'analisi con western blotting degli spermatozoi sessati ha evidenziato poche differenze con i Freschi; inoltre nessuna differenza è registrabile all'immunofluorescenza tra i pattern degli spermatozoi freschi e sessati, con l'eccezione del pattern AR.

La modificazione dei pattern del CTC, che sono legati all'entrata del calcio nella cellula, può essere spiegata con l'apertura dei canali del calcio voltaggio-dipendenti a causa del forte campo elettromagnetico prodotto dalla macchina, che non determina però un'attivazione effettiva di tutta la cascata di eventi intracellulari. Il coinvolgimento del campo elettromagnetico è stato descritto da Rath e collaboratori (2009) ed anche Spinaci et al. (2010) hanno riportato una situazione simile negli spermatozoi di verro dopo refrigerazione e riscaldamento. Studi precedenti hanno inoltre dimostrato una riorganizzazione dell'espressione delle proteine Heat shock 70 (Hsp70) dopo sessaggio (Spinaci et al., 2006). L'espressione di questa proteina diminuisce durante la conservazione liquida degli spermatozoi di verro probabilmente a causa di un effettivo consumo (Spinaci et al., 2010). Va sottolineato che Hsp70 e colorazione CTC sono due parametri legati alla membrana che cambiano profondamente a seguito del processo di sessaggio, assumendo pattern simili al seme capacitato (Maxwell et al., 1997; Spinaci et al., 2006, 2010; Maxwell e Johnson, 1997; Maxwell et al., 1998).

Come già riportato, le tecnologie come il sessaggio e la crioconservazione sono ritenute in grado di attivare in senso capacitativo gli spermatozoi nel maiale (Green e Watson, 2001; Bravo et al., 2005). In questa specie il raffreddamento e il riscaldamento inducono uno stato capacitativo efficace nell'inizializzare la reazione acrosomiale (Green e Watson, 2001; Bravo et al., 2005; Kaneto et al., 2002). C'è tuttavia una differenza tra la vera capacitazione indotta in condizioni appropriate in vitro o in vivo, e la "falsa" capacitazione, che può essere ritenuta uno stato degli spermatozoi determinato da cause stressanti.

Non possiamo definire chiaramente questa situazione dopo sessaggio, perché i nostri dati dimostrano che alcuni parametri (soprattutto CTC ed in minor parte l'actina) vanno incontro a modificazioni simil-capitative, mentre la fosforilazione dei residui di tirosina non lo fa. Interessante è notare che gli spermatozoi sessati di maiale sono molto efficaci nella fertilizzazione in vitro senza la pre-incubazione in condizioni capacitanti (Rath et al., 1999; Spinaci et al., 2005), suggerendo quindi che il processo induca una vera capacitazione.

In conclusione questo studio ha esaminato negli spermatozoi sessati di verro alcuni parametri legati alla capacitazione ed abbiamo dimostrato che i cambiamenti di membrana sono simili a quelli che avvengono a seguito della capacitazione e che questi cambiamenti sono principalmente dovuti a una destabilizzazione della membrana stessa. La riorganizzazione

del citoscheletro di actina e la fosforilazione dei residui di tirosina hanno dimostrato di essere meno suscettibili di cambiamenti a seguito del processo di sessaggio, anche se sono state osservate alcune modificazioni nella distribuzione delle subpopolazioni.

Bibliografia

Bailey J.L., Tardif S., Dubé C., Beaulieu M., Reyes-Moreno C., Lefièvre L., Leclerc P. (2005) Use of phosphoproteomics to study tyrosine kinase activity in capacitating boar sperm. Kinase activity and capacitation. *Theriogenology*. 63(2), 599-614.

Berger T., Turner K.O., Meizel S., Hedrick J.L. (1989) Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. *Biol Reprod*. 40(3), 525-30.

Brackett B.G., Oliphant G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Reprod*. 12, 260-74.

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248-254.

Bravo M.M., Aparicio I.M., Garcia-Herreros M., Gil M.C., Peña F.J., Garcia-Marin L.J. (2005) Changes in tyrosine phosphorylation associated with true capacitation and capacitation-like state in boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 71(1), 88-96.

Breitbart H., Cohen G., Rubinstein S. (2005) Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Rev Reprod*. 129(3), 263-268.

Brener E., Rubinstein S., Cohen G., Shternall K., Rivlin J., Breitbart H. (2003) Remodeling of actin cytoskeleton during mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*. 68, 837-845.

Byrd W. (1981) In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool*. 215(1), 35-46.

Castellani-Ceresa L., Brivio M.F., Radaelli G. (1992) F-actin in acrosome-reacted boar spermatozoa. *Mol Reprod Dev*. 33, 99-107.

Castellani-Ceresa L., Mattioli M., Radaelli G., Barboni B., Brivio M. F. (1993) Actin polymerization in boar spermatozoa: fertilization is reduced with use of cytochalasin D. *Mol Reprod Dev*. 36, 203-211.

Colás C., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T., Cebrián-Pérez L.A. (2009) Changes in actin distribution of ram spermatozoa under different experimental conditions. *Theriogenology*. 44, 221-227.

De Graaf S.P., Beilby K.H., Underwood S.L., Evans G., Maxwell W.M.C. (2009) Sperm sexing in sheep and cattle: The exception and the rule. *Theriogenology*. 71, 89-97.

Flesch F.M., Gadella B.M. (2000) Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 1469(3), 197-213.

- Flores E., Fernández-Novell J.M., Peña A., Rigau T., Rodríguez-Gil J.E. (2010) Cryopreservation-induced alterations in boar spermatozoa mitochondrial function are related to changes in the expression and location of midpiece mitofusin-2 and actin network. *Theriogenology*. 74, 354-63.
- Fraser L.R., Abeydeera L.R., Niwa K. (1995) Ca(2+)-regulating mechanisms that modulate bull sperm capacitation and acrosomal exocytosis as determined by chlortetracycline analysis. *Mol Reprod Dev*. 40(2), 233-241.
- Gadella B.M. (2008) Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. *Anim Reprod Sci*. 107, 229-236.
- Green C.E., Watson P.F. (2001) Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. *Reproduction*. 122(6), 889-898.
- Harrison R.A.P., Gadella B.M. (2005) Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. *Theriogenology*. 62, 342-351.
- Johnson L.A. (2000) Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Anim Reprod Sci*. 60-61, 93- 107.
- Jones R., James P.S., Oxley D., Coadwell J., Suzuki-Toyota F., Howes E. (2008) The equatorial subsegment in mammalian spermatozoa is enriched in tyrosine phosphorylated proteins. *Biol Reprod*. 79(3), 421-431.
- Kaneto M., Harayama H., Miyake M., Kato S. (2002) Capacitation-like alterations in cooled boar spermatozoa: assessment by the chlortetracycline staining assay and immunodetection of tyrosine-phosphorylated sperm proteins. *Anim Reprod Sci*. 73(3-4), 197-209.
- Mattioli M., Barboni B., Lucidi P., Seren E. (1996) Identification of capacitation in boar spermatozoa by chlortetracycline staining. *Theriogenology*. 45(2), 373-381.
- Maxwell W.M., Johnson L.A. (1997) Chlortetracycline analysis of boar spermatozoa after incubation, flow cytometric sorting, cooling, or cryopreservation. *Mol Reprod Dev*. 46, 408-418.
- Maxwell W.M., Welch G.R., Johnson L.A. (1997) Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 8, 1165-1178.
- Maxwell W.M., Long C.R., Johnson L.A., Dobrinsky J.R., Welch G.R. (1998) The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*. 1, 433-440.
- Maxwell W.M., Johnson L.A. (1999) Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*. 52 1353-1362.
- Rath D., Long C.R., Dobrinsky J.R., Welch G.R., Schreier L.L., Johnson L.A. (1999) In vitro production of sexed embryos for gender preselection: high-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer. *J Anim Sci*. 77, 3346-3352.

Rath D., Moench-Tegeder G., Taylor U., Johnson L.A. (2009) Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*. 71, 22-29.

Spinaci M., De Ambrogi M., Volpe S., Galeati G., Tamanini C., Seren E. (2005) Effect of staining and sorting on boar sperm membrane integrity, mitochondrial activity and in vitro blastocyst development. *Theriogenology* 64, 191-201.

Spinaci M., Volpe S., Bernardini C., De Ambrogi M., Tamanini C., Seren E, Galeati G. (2006) Sperm sorting procedure induces a redistribution of Hsp70 but not Hsp60 and Hsp90 in boar spermatozoa. *J Androl.* 27(6), 899-907.

Spinaci M., Vallorani C., Bucci D., Bernardini C., Tamanini C., Galeati G. (2010) Effect of liquid storage on sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. 74, 741-748.

Tardif S., Dubé C., Chevalier S., Bailey J.L. (2001) Capacitation is associated with tyrosine phosphorylation and tyrosine kinase-like activity of pig sperm proteins. *Biol Reprod.* 65(3), 784-792.

Urner F., Sakkas D. (2003) Protein phosphorylation in mammalian spermatozoa. *Reproduction.* 125, 17-26.

Vadnais M.L., Galatino-Homer H.L., Althouse G.C. (2007) Current concepts of molecular events during bovine and porcine spermatozoa capacitation. *Arch Androl.* 53, 109-123.

Vazquez J.M., Parrilla I., Roca J., Gil M.A., Cuello C., Vazquez J.L., Martínez E.A. (2009) Sex-sorting sperm by flow cytometry in pigs: Issues and perspectives. *Theriogenology*. 71, 80-88.

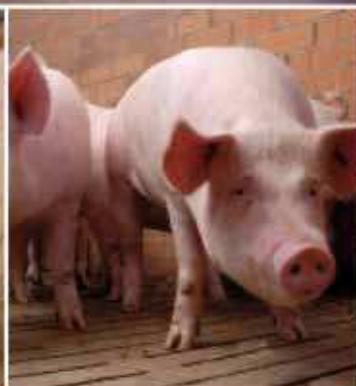
Yanagimachi R., (2008) Mammalian fertilization. In: Knobil E., Neil J. D. et al. *The physiology of reproduction*. Vol 1. New York Raven Press Ltd. 2008, pp 189-319.

Testo tratto dall'Articolo "Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa", Bucci et al., (2012) *Theriogenology*, 77, 1206-1216.



Il Riferimento per
la **Prevenzione** e salute
della tua **Scrofaia**

www.hipra.com





www.izo.it



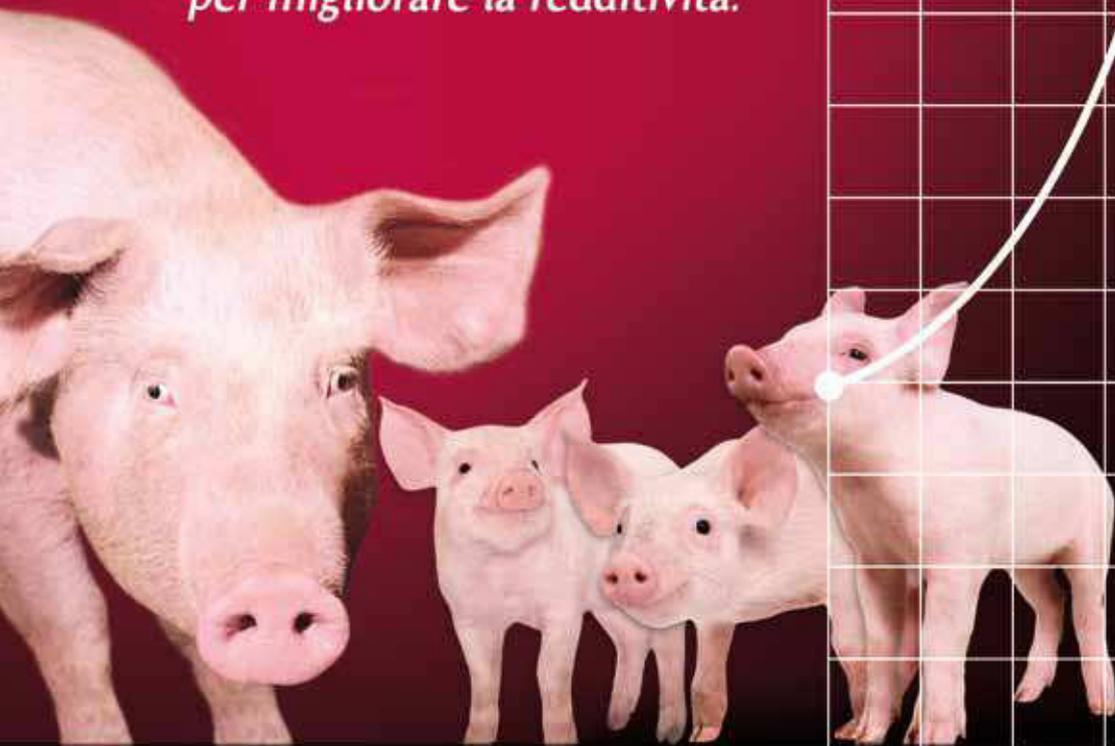
IZO da oltre quarant'anni produce farmaci e vaccini ad uso veterinario. Nasce così una gamma di prodotti altamente affidabili in grado di garantire, insieme alla professionalità dei medici Veterinari e la cura degli allevatori, il benessere assoluto degli animali da reddito.

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 - Viale Luigi Bodio, 37/b - 20158 Milano
Tel. 02.39.39.331 - Fax 02.39.39.3302 - E-mail: merial.italia@merial.com - www.merial.com

© Copyright 2013. Tutti i diritti riservati.



Il **PRIMO** vaccino intradermico
nei confronti di *Mycoplasma*
hyopneumoniae



Efficace e pratico con una sola dose

**Fai un salto in avanti,
esegui le vaccinazioni in modo facile
e senza l'impiego di aghi**



Meno lesioni polmonari, più profitto

MSD Animal Health Srl
Via F.lli Cervi snc
Centro Direzionale Milano Due
Palazzo Canova
20090 Segrate (MI) - Italia
www.msd-animal-health.it



MSD
Animal Health



INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI ANIMAL HEALTH PRODUCT



> RICERCA, SVILUPPO, QUALITÀ ED INNOVAZIONE

Sono i cardini sui quali poggia la filosofia operativa della TRE I e che hanno permesso di ottenere la registrazione di tecnologie, marchi e prodotti che si caratterizzano per la particolare attenzione alla salvaguardia della salute animale, al rispetto dell'ambiente e degli utilizzatori.



Tra questi la tecnologia DPS, grazie alla quale si realizzano microsfere da matrici lipidiche nelle quali è possibile inglobare principi attivi di vario genere, che assicurano biodisponibilità, omogeneità, stabilità e sicurezza d'impiego.

INDUSTRIA ITALIANA
INTEGRATORI TREI S.p.A.

AMMINISTRAZIONE
E STABILIMENTO
ADMIN. AND PRODUCTION PLANT
Via Alfaro 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

info@treivet.com
www.treivet.com

**RENDIAMO AL CIRCOVIRUS
LA VITA IMPOSSIBILE.**



Contro il Circovirus dei suini, c'è una nuova frontiera di profilassi vaccinale. Un territorio finora inesplorato, raggiunto grazie a una tecnologia unica in Europa, basata su un virus chimera. Un vaccino a virus intero inattivato che, somministrato in dose singola, offre una protezione di lunga durata. Per saperne di più, chiedi al tuo veterinario di fiducia.

zoetis

Pfizer Animal Health Italia s.r.l.

“Gli uomini si capiscono solo nella misura in cui sono animati dalle stesse passioni”

Stendhal



80
ans
1933 - 2013

Vétoquinol
Signe de Passion

Nel settore degli animali da reddito l'aspetto economico è un fattore chiave, per questo Vétoquinol ha lanciato trattamenti ad azione rapida, che hanno come obiettivo il benessere degli animali senza tralasciare le esigenze del cliente finale. Per coniugare entrambi gli aspetti, Vétoquinol offre protocolli specifici in materia di farmaci anti-infettivi ed anti-infiammatori, con la sicurezza di 80 anni di esperienza sul campo.

Vétoquinol Italia S.r.l.
Via Piana, 265 - 47032 Bertinoro (FC) Italy
Tel. (+39) 0543.462411 Fax (+39) 0543.448644
www.vetoquinol.it - info@vetoquinol.it

Vétoquinol
Signe de Passion

