

Le iniziative promosse ed organizzate dalla SIPAS nel 2015
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

HIPRA ITALIA

HUVEPHARMA

MERIAL ITALIA

MSD Animal Health

INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TRE I

VETOQUINOL ITALIA

ZOETIS ITALIA

ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI **2015**



ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLI
MEETING ANNUALE



Centro Fiera del Garda - Montichiari (BS)

19-20 Marzo 2015

In copertina: “Maiali” *olio su tela - Franz Marc, 1880-1916*

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

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

2015

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XLI Meeting Annuale, Montichiari (BS), 19-20 Marzo 2015.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2015.

ISBN 978-88-903311-7-6

INDICE

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

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO **L'APPROCCIO DIAGNOSTICO IN ALLEVAMENTO**

Bologna, 3 Ottobre 2014

Kerkaert B. R.

MONITORAGGIO DEI SETTORI CHIAVE PER LO STATO SANITARIO DEGLI ALLEVAMENTI PER MIGLIORARE LE PERFORMANCE SECONDO IL "SISTEMA PIPESTONE"	p. 25
---	-------

ATTI DEL XLI MEETING ANNUALE

Montichiari (BS), 19-20 Marzo 2015

TAVOLA ROTONDA

ASPETTI GESTIONALI ALIMENTARI E SANITARI DEL SUINO IN ACCRESCIMENTO

Scheepens K.

UN BUON INIZIO CON I SUINI SVEZZATI: NON RALLENTARLI, MA INDICARGLI LA GIUSTA STRADA!	p. 31
--	-------

Turci S.

ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO DI NATURA NON-INFETTIVA E DEI PARAMETRI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO L'ESPRESSIONE DELLE PRINCIPALI PATOLOGIE DEL SUINO IN ACCRESCIMENTO: L'ESPERIENZA FRANCESE	p. 35
---	-------

TAVOLA ROTONDA

IL SUINO IN ACCRESCIMENTO: IL CONTROLLO DELLE PATOLOGIE FINO ALL'ERADICAZIONE

De Jong M.

CONTROLLO ED ERADICAZIONE DELLE MALATTIE; ESPE- RIENZE PERSONALI SU ALCUNE MALATTIE DEL SUINO.....	p. 47
---	-------

Burrough E. R.

EPIDEMIOLOGIA DELLA DISSENTERIA SUINA IN USA E RECENTI RICERCHE RIGUARDO FATTORI DI RISCHIO, ALIMENTAZIONE E TECNICHE DIAGNOSTICHE	p. 53
--	-------

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Tonon F., Luccarda S., Stelletta C., Vencato J., Romagnoli S.*
**MONITORAGGIO DELL'EFFICACIA DELLA CASTRAZIONE
 CHIMICA ED IMMUNOLOGICA DEL VERRO** p. 63
- Mazzoni C., Scollo A., Gherpelli M., Bonilauri P., Kirkwood R.,
 De Rensis F.*
**EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ALLILTREMBO-
 LONE PER UN PERIODO RIDOTTO RISPETTO A QUELLO
 STANDARD SULLA SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO E
 SULLA FERTILITÀ DI SCROFETTE PUBERI** p. 71
- Scollo A., Contiero B., Tavella G., Raffi V., Amorico V., Gottardo F.,
 Mazzoni C.*
**ANALGESIA DEL SUINETTO ALLA CASTRAZIONE: EFFET-
 TO DEL DICLOFENAC SU PARAMETRI COMPORTAMENTA-
 LI E FISIOLOGICI** p. 77
- Maisano A. M., Luini M., Attanasio G., Vezzoli F.*
**IL BENESSERE ANIMALE DEL SUINO GRASSO ITALIANO
 IN ALLEVAMENTO: VALUTAZIONE AL MACELLO** p. 85
- Zolin C., Costa A., De Faveri E., Sala V.*
**INDAGINI SULLA CORRELAZIONE TRA LO SCHIACCIA-
 MENTO DEI SUINETTI IN SALA PARTO E LE LESIONI
 PODALI NELLE SCROFE** p. 95
- Salvini F., Guadagnini G., Paoletti F., Bresaola M., Ottolini F.,
 Gibellini M.V., Mazzoni C., Scollo A., Amorico A.*
**POLMONITE ENZOOTICA E LESIONI AL MACELLO: STU-
 DIO PRELIMINARE SULLA CORRELAZIONE FRA PUNTEG-
 GIO MADEC, PERCENTUALE DI TESSUTO POLMONARE
 COLPITO E PERDITA ECONOMICA** p. 107
- Merlino V., Massaglia S., Verduna T., Borra D., Rambozzi L.*
**INCIDENZA DELL'ASCARIDIOSI SUINA SUI COSTI DI
 ALIMENTAZIONE E SULLA PLV (PRODUZIONE LORDA
 VENDIBILE) AZIENDALE: DATI PRELIMINARI** p. 121
- Maioli G., Scollo A., Leotti G., Defilippo F., Veloci M., Bonilauri P.,
 Dottori M., Luppi A.*
**PREVALENZA DI ROGNA SARCOPTICA IN PARTITE DI
 SUINI MACELLATI** p. 129

<i>Bresaola M., Salvini F., Guadagnini G., Paoletti F., Ottolini F., Gibellini M.</i> DIFFERENTI STRATEGIE DI ALIMENTAZIONE DI SUINETTI SOTTOSCRFOA: ESPERIENZA DI CAMPO.....	p. 135
<i>Bazzoli A., Demey V., Guillou D., Hocke N.</i> STUDIO PRELIMINARE DEL PROFILO FERMENTATIVO DELLE BRODE PER SUINI IN FUNZIONE DELLA LORO COMPOSIZIONE.....	p. 143
<i>Massacci F.R., Ciuti F., Cucco L., De Luca S., Maresca C., Medici L., Panicià M., Scoccia E., Silenzi V., Pezzotti G., Magistrati C.F.</i> CONTAMINAZIONE DA <i>SALMONELLA</i> SPP. IN DUE MATTATOI DEL CENTRO ITALIA: UN APPROCCIO QUAN- TITATIVO	p. 151
<i>De Luca S., Cucco L., Massacci F.R., Maresca C., Panicià M., Scoccia E., Staffolani M., Pezzotti, Magistrati C.F.</i> LA CONTAMINAZIONE DA <i>SALMONELLA</i> DELLE CARCASSE DI SUINI MACELLATI E' CORRELATA AL QUANTITATIVO DI <i>SALMONELLA</i> PRESENTE A LIVELLO CIECALE	p. 167
<i>Ruggieri J., Pesciaroli M., Martinelli N., Chirullo B., Scaglione F.E., Pregel P., Ammendola S., Lazzaro M., Giacomini E., Ossiprandi M.C., Battistoni A., Bollo E., Pasquali P., Alborali G.L.</i> CONTROLLO DELLE INFEZIONI DA <i>SALMONELLA</i> NEL SUINO: STRATEGIE VACCINALI	p. 175
<i>Zavattini S., Sala V., Gusmara C., Guadagnini G., Costa A.</i> VALUTAZIONE DEI FATTORI CONDIZIONANTI LA STREPTOCOCCOSI NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO	p. 183
<i>Sandri G., Giovanardi D., Pesente P., Rossi G.</i> STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA DI <i>STREPTOCOCCUS</i> <i>SUIS</i> (MEDIANTE UTILIZZO DI SIEROTIPIZZAZIONE E DETERMINAZIONE DELLA PRESENZA DI FATTORI DI VIRULENZA) E DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA (AMR) IN UNA FILIERA PRODUTTIVA ITALIANA	p. 193
<i>Gibellini M., Bonilauri P., Gherpelli Y., Giovanardi D., Marzani K., Torri D., Dottori M., Ferro P., Scandurra S., Maioli G., Hidalgo A., Luppi A.</i> PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA ASSOCIATI A <i>E. COLI</i> ISOLATI DA SUINI CON DIARREA POST SVEZZA- MENTO (PWD) IN ITALIA.....	p. 199
<i>De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V.</i> PRESENZA DI MRSA NEI PARTECIPANTI AL MEETING SIPAS 2014	p. 209

Giacomini E., Boniotti M.B., Lavazza A., Lazzaro M., Papetti A., Salogni C., Giovannini S., Luppi A., Nigrelli A., Alborali G.L.
 FOCOLAI DI DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED) IN TRE ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA..... p. 217

Tucciarone C., Franzo G., Dotto G., Gigli A., Ceglie L., Drigo M.
 COMMERCIO INTERNAZIONALE, EVOLUZIONE E DISSEMINAZIONE VIRALE: ANALISI DELL'ETERogeneità DI PCV2 IN ITALIA p. 223

Foni E., Chiapponi C., Baioni L., Merenda M., Mandalari C., Luppi A., Rugna G., Tamba M., Pellacini M., Forlenza J.
 ELEVATA VARIABILITA' GENETICA DI VIRUS INFLUENZALE SUINO IN UNA DELIMITATA AREA DELLA PIANURA PADANA p. 231

POSTERS

Amorico A., De Rensis F., Scollo A., Bonilauri P., Mazzoni C.
 L'EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ALLILTREMBOLONE SULLA FERTILITÀ E PROLIFICITÀ DELLA SCROFETTA NON VARIA CON LA STAGIONE DELL'ANNO IN CUI È ESEGUITO IL TRATTAMENTO p. 243

Catania S., Rosales Ruben S., Ustulin M., Fincato A., Gobbo F., Vio D.
 DIAGNOSI DIRETTA MEDIANTE ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI *MYCOPLASMA* SPP. NEL SETTORE SUINICOLO, UN'ULTERIORE POSSIBILITÀ DIAGNOSTICA p. 249

Scollo A., Ortolan T., Tonon F., Veloci M., Mazzoni C.
 EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI MELOXICAM ALLE SCROFE NEL POST PARTO: VIA INTRAMUSCOLARE VERSUS VIA ORALE p. 255

Tonon F., Stelletta C., Scollo A., Vencato J., Romagnoli S.
 EFFETTO E DURATA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO PER LA CASTRAZIONE IMMUNOLOGICA A SCROFE PUBERI. INDAGINE PRELIMINARE p. 261

Veloci M., Mazzoni C., Cinti E., Borri E., Scollo A., De Rensis F.
 CATERIZZAZIONE NON INVASIVA PER PRELIEVI FREQUENTI NEL SUINO p. 267

PREMIO GUADAGNINI 2015

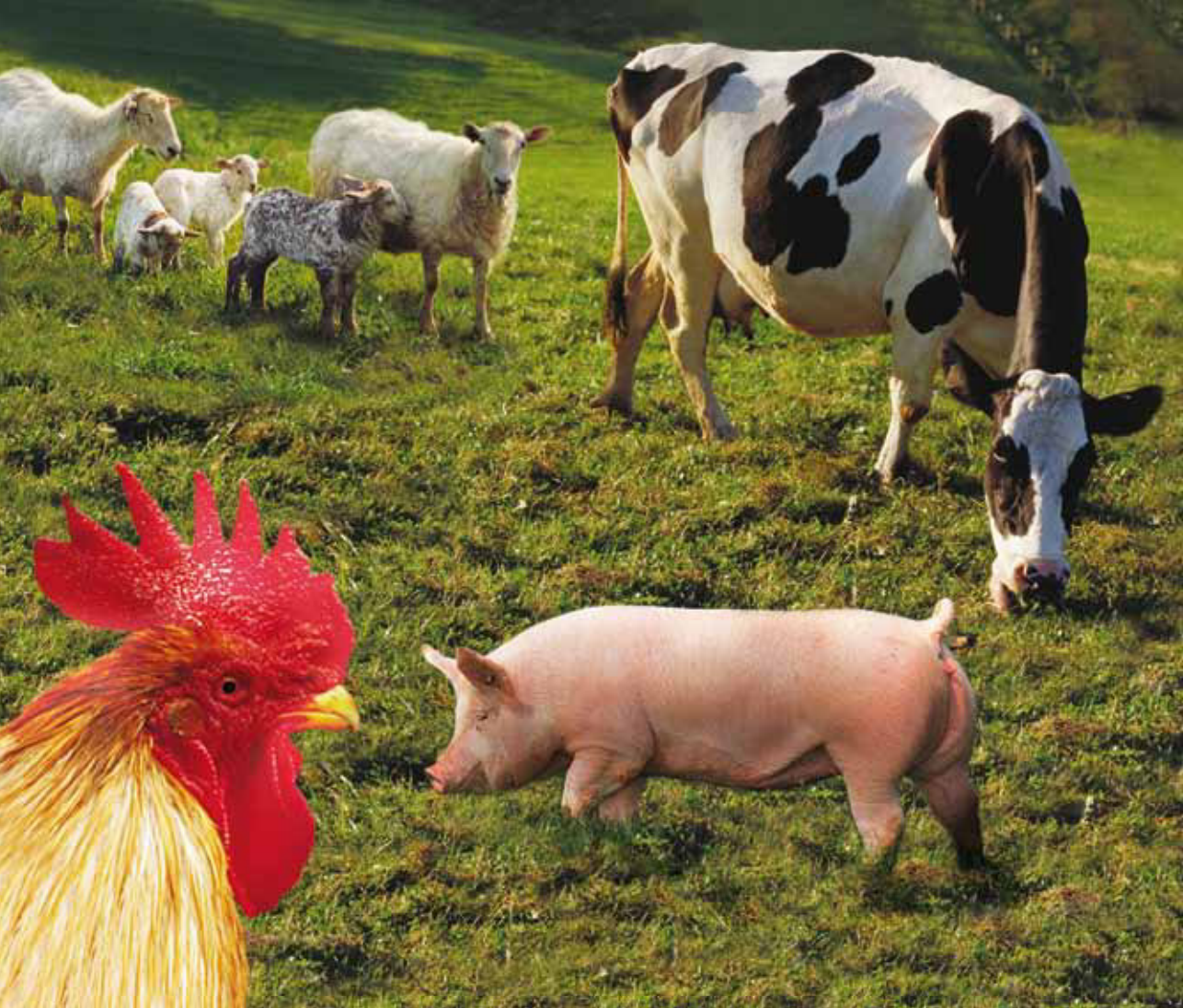
*Martelli G., Nannoni E., Grandi M., Bonaldo A., Zaghini G., Vitali M.,
Biagi G., Sardi L.*

EFFETTI DI FOTOPERIODI DI DIVERSA DURATA SU
PARAMETRI PRODUTTIVI, COMPORTAMENTO, QUALITÀ
DI CARNI E PROSCIUTTI DI SUINI PESANTI ITALIANI p. 277

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2015

Morando S., Martano G., Tomassone L., Tarantola M.

IMPATTO DI ALCUNI PARAMETRI GESTIONALI SUL
BENESSERE DELLE SCROFE ALLEVATE IN BOX
COLLETTIVI p. 293



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

Efficacia senza compromessi



Miscelato “Fresco”





COMMITTED TO
ANIMAL WELFARE



Via Marina, 6 - 20121 Milano (MI) - Italia
info@calier.it - farmacovigilanza@calier.it
www.calier.it
Tel: (+39) 331 97 44 978

cevolution

Iniettiamo progresso



L'evoluzione dell' antibioticoterapia



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



Proteggiamolo insieme dal *Mycoplasma hyopneumoniae*

Vaccinazione ancora più precoce

Elanco Animal Health

Divisione della Eli Lilly Italia S.p.A.
Via Gramsci, 731 - 50019 Sesto F.no (FI)
Tel. 055 4257.031 - Fax 055 4257.068
www.elanco.it e-mail: Elanco_FA_Italia@elanco.com

Elanco



Innovazione e Ricerca al servizio della produzione animale

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

Fatro una trasparenza Visibile

Eccellenza del Made in Italy
— dal 1947 —

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



la salute animale per la salute dell'uomo

PREFAZIONE

Siamo giunti alla 41a Edizione del Meeting Annuale della nostra Società. E' tradizione consolidata presentare gli Atti SIPAS che riuniscono tutti i lavori scientifici scaturiti dall'attività svolta dopo il precedente meeting incluse le comunicazioni scientifiche e le presentazioni che vengono svolte a Montichiari. Il Centro Fiera del Garda è stato scelto per la seconda volta consecutiva a conferma che Montichiari risulta essere strategico, ospitale e posto nel cuore della produzione suinicola nazionale.

Per me e per tutto il Consiglio Direttivo è sempre un grande piacere e un motivo di orgoglio vedere come il numero di partecipanti sia sempre elevato e come i lavori siano seguiti con grande attenzione. La SIPAS rappresenta l'opportunità per un confronto tra gli operatori del settore e un momento di conoscenza, condivisione e aggiornamento delle problematiche che coinvolgono l'allevamento del suino.

Il suino in accrescimento è l'argomento al centro delle due tavole rotonde: nella prima vengono approfonditi gli aspetti gestionali e alimentari mentre nella seconda gli aspetti sanitari riferiti al controllo delle patologie e alla loro eradicazione.

Le comunicazioni scientifiche dei nostri soci testimoniano la maturità di un confronto e l'esigenza di un costante aggiornamento. L'attribuzione del Premio Guadagnini, giunto alla sua 16ma Edizione, ne dimostra l'eccellenza.

La presenza di lavori di colleghi che operano quotidianamente negli allevamenti segnalando le loro esperienze e di ricercatori che propongono i risultati delle loro attività rappresenta un connubio vincente per la SIPAS.

La sinergia tra chi lavora in allevamento e chi opera in laboratorio costituisce la punta di diamante della nostra società tesa a consolidare il suo ruolo e a ottimizzare i rapporti dei suoi soci.

La professionalità del Medico Veterinario si dovrà sempre più svolgere a tutti i livelli nel pieno rispetto della conoscenza scientifica e della coscienza della professione. Solo dimostrando apertura culturale nei confronti del nuovo e accoglienza delle esperienze dei colleghi aumenterà la consapevolezza di far parte della stessa categoria.

Un ringraziamento a tutti i relatori che con competenza e professionalità hanno partecipato agli eventi e ai colleghi del Consiglio Direttivo per l'impegno e lo spirito di servizio dimostrato.

Un particolare ringraziamento a MV Congressi per l'eccellente organizzazione degli eventi e alle Industrie Salute Animale per la fiducia accordata e per il sostegno finanziario che ha permesso la realizzazione delle iniziative.

Un grazie a tutti voi per avere contribuito e partecipato alle iniziative della Società.

Brescia, 19 marzo 2015

Il Presidente
G. Loris Alborali

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**L'APPROCCIO DIAGNOSTICO
IN ALLEVAMENTO**

Bologna, 3 Ottobre 2014

MONITORAGGIO DEI SETTORI CHIAVE PER LO STATO SANITARIO DEGLI ALLEVAMENTI PER MIGLIORARE LE PERFORMANCE SECONDO IL “SISTEMA PIPESTONE”

BARRY R. KERKAERT
DVM

Pipestone Veterinary Services
Pipestone Minnesota, United States of America

L'evoluzione continua del Sistema Pipestone e dell'industria suina negli Stati Uniti va di pari passo con la maggiore attenzione per la salute e la cura degli animali. Questa attenzione origina da diversi aspetti. Il primo e più importante è il benessere animale, che è anche l'obiettivo centrale del Sistema Pipestone e dell'industria suina negli Stati Uniti. Gli allevatori e i tecnici del settore si propongono di fornire ai loro animali le strutture e le condizioni adeguate a mantenere un ambiente che ne promuova il benessere. Non va ignorato che l'importanza che viene data allo stato sanitario degli animali, ha anche diversi risvolti economici. Se da una parte servono generalmente spese maggiori e più rigore per mantenere la salute del bestiame, dall'altra parte, animali sani hanno prestazioni migliori, che portano ad un maggiore ritorno economico per l'allevatore. Inoltre, non va dimenticato che anche per chi lavora in allevamento è più appagante accudire animali sani.

Nel sistema Pipestone, i dati di produzione vengono registrati e utilizzati per misurare non solo le performance biologiche degli animali, ma anche il loro stato di salute. I singoli dati di produzione delle scrofe vengono utilizzati per tutti gli allevamenti di scrofe gestiti dal sistema Pipestone. Questi dati vengono aggiornati e comunicati ogni settimana agli allevatori e al veterinario aziendale. Viene inoltre tenuto aggiornato un riepilogo settimanale delle informazioni riguardo gli indicatori sanitari chiave come tasso di mummificati, tasso di natimortalità e di mortalità dei suinetti e delle scrofe. Questi dati possono essere utilizzati dal veterinario e dal team aziendale per verificare la presenza di problemi di salute latenti in allevamento.

I dati produttivi vengono anche utilizzati per monitorare gli allevamenti da ingrasso, perché rappresentano indicatori oggettivi dello stato di salute dei suini in ingrasso. Possono essere utilizzati per controllare un singolo gruppo di suini, ma anche l'intero ciclo produttivo di suini (Figura 1). I dati principali dovrebbero includere la mortalità, registrata ogni settimana, la fase di ingrasso nella quale si verifica la mortalità, l'assunzione di cibo, il tasso di crescita e i tassi di conversione alimentare. Monitorando settimanalmente le performance produttive possono essere identificati problemi di salute e può essere determinato se questi siano un problema dell'allevamento, della gestione, o del flusso produttivo.

Oltre all'utilizzo della registrazione settimanale dei dati di produzione, vengono anche utilizzati specifici test di laboratorio. Gli attuali test diagnostici, tra i quali la PCR e l'utilizzo di campioni di saliva hanno permesso un monitoraggio veloce, semplice e sensibile dello stato sanitario di ogni singolo allevamento di scrofe. L'utilizzo di questi test ha permesso al sistema Pipestone di monitorare con più rigore lo stato di malattia dei suini svezzati, a livello della scrofaia d'origine. Una volta al mese il sistema Pipestone monitora tutti i suinetti svezzati per PRRSV e influenza suina in PCR. Se necessario possono essere eseguite altre PCR sui campioni di saliva. Dal monitoraggio di routine il Sistema Pipestone è in grado di descrivere in modo più adeguato lo stato di salute dei suinetti svezzati e di fornire al veterinario aziendale gli strumenti per adeguare il piano sanitario per i suinetti, quando saranno svezzati.

Figura 1: dati riguardanti tutti gruppi di suini in un ciclo produttivo.

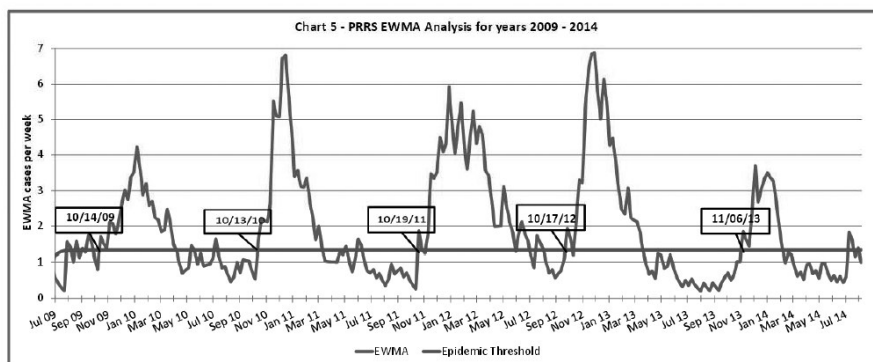
										Total Dead For Period:	440	95	125	109	111
										% Dead For Period:	0.40%	0.09%	0.11%	0.10%	0.10%
										% of Total Dead For Period:	100.00%	21.59%	28.41%	24.77%	25.23%
										Production Year:		2014		2014	
										Production Quarter		Q3		Q3	
												08/17/2014		08/24/2014	
												08/23/2014		09/06/2014	
												09/07/2014		09/13/2014	
Producer	Site	Group	Group Type/Stage	In	Current Group Inventory	Grp Start Date	Week on Feed	# Dead to Date	Mort to Date	# Dead for Report Period	34	35	36	37	
Spronk Brothers	Leon Kracht	SB1405FRT	Wean to Finish	2,703	28	02/17/2014	31	60	2.22%	2	2				
Spronk Brothers	Hubbling WF	SB1405SHW	Wean to Finish	2,576	167	02/17/2014	31	163	6.33%	9	1	6	2		
Spronk Brothers	Burkhardt	SB1406BHT	Wean to Finish	2,185	210	02/24/2014	30	72	3.30%	1	1				
Spronk Brothers	Faber	SB1406FAB	Wean to Finish	5,211	640	02/28/2014	29	197	3.78%	21	5	9	6	1	
Spronk Brothers	Dunn-SB	SB1407DUN	Wean to Finish	5,310	970	03/07/2014	28	153	2.88%	38	12	8	11	7	
Spronk Brothers	Leon Kracht	SB1409HOM	Wean to Finish	2,744	1,302	03/17/2014	27	71	2.59%	17	7	4	3	3	
Spronk Brothers	Iso Site	SB1410ISO	Wean to Finish	2,677	1,898	03/24/2014	26	94	3.51%	24	6	8	5	5	
Spronk Brothers	Sundal	SB1410SUN	Wean to Finish	2,646	1,692	03/28/2014	25	99	3.74%	17	4	2	2	7	
Spronk Brothers	Hiawatha West N	SB1411HWN	Wean to Finish	2,544	1,735	03/31/2014	25	70	2.75%	11	2	4	2	5	
Spronk Brothers	PVL	SB1413PVL	Wean to Finish	4,947	4,844	04/18/2014	22	103	2.08%	41	9	8	12	12	
Spronk Brothers	Fruechte	SB1414FRT	Wean to Finish	2,717	2,655	04/23/2014	21	62	2.28%	10	5	3	2	2	
Spronk Brothers	Crawford	SB1415CRF	Wean to Finish	2,553	2,509	05/02/2014	20	44	1.72%	15	4	1	5	5	
Spronk Brothers	Titian	SB1416TTN	Wean to Finish	5,076	5,006	05/07/2014	19	70	1.38%	22	5	4	9	4	
Spronk Brothers	Home Site	SB1417HOM	Wean to Finish	2,717	2,663	05/16/2014	18	54	1.99%	8	3		2	3	
Spronk Brothers	Iso Site	SB1418ISO	Wean to Finish	2,472	2,418	05/21/2014	17	54	2.18%	12	1	5	3	3	
Spronk Brothers	Burkhardt	SB1419BHC	Wean to Finish	2,104	2,082	05/29/2014	16	22	1.05%	6	1	1	1	3	
Spronk Brothers	Hiawatha West N	SB1421RB2	Wean to Finish	4,428	4,387	05/27/2014	17	41	0.93%	12	4	5	2	1	
Spronk Brothers	Arends	SB1420ARD	Wean to Finish	5,209	5,128	06/04/2014	15	81	1.56%	21	3	7	2	9	
Spronk Brothers	CaiSota RB2	SB1421RB2	Wean to Finish	4,464	1,905	06/13/2014	14	65	1.46%	13	3	2	3	5	
Spronk Brothers	Armies	SB1422ARN	Wean to Finish	2,918	2,885	06/18/2014	13	33	1.13%	23	4	7	6	6	
Spronk Brothers	Fruechte	SB1423FRT	Wean to Finish	2,559	2,532	06/25/2014	12	27	1.06%	15	8	1	3	3	
Spronk Brothers	Vander Pol	SB1424MVP	Wean to Finish	2,482	2,453	06/30/2014	12	29	1.17%	12	2	3	7		
Spronk Brothers	Home Site	SB1425HOM	Wean to Finish	2,025	2,013	07/07/2014	11	12	0.59%	7	4	1	1	2	
Spronk Brothers	Iso Site	SB1425ISO	Wean to Finish	2,067	2,041	07/07/2014	11	26	1.26%	9		6	1	2	
Spronk Brothers	Bearcat	SB1426BCT	Wean to Finish	5,226	5,186	07/11/2014	10	40	0.77%	24	3	10	3	8	
Spronk Brothers	AHenning	SB1427HEN	Wean to Finish	5,080	5,051	07/21/2014	9	29	0.57%	13	2	3	3	5	
Spronk Brothers	Hiawatha West N	SB1427HWN	Wean to Finish	2,594	2,589	07/25/2014	8	5	0.19%	4		1	1	2	
Spronk Brothers	Baker	SB1428BKR	Wean to Finish	5,139	5,120	07/30/2014	7	19	0.37%	14	3	7	4		
Spronk Brothers	Fruechte	SB1430FRT	Wean to Finish	2,506	2,500	08/11/2014	6	6	0.24%	6		3	2	1	
Spronk Brothers	Hubbling WF	SB1430SHW	Wean to Finish	2,542	2,542	08/15/2014	5		0.00%	0					
Spronk Brothers	Home Site	SB1431HOM	Wean to Finish	2,781	2,779	08/22/2014	4	2	0.07%	2			1	1	
Spronk Brothers	Iso Site	SB1431ISO	Wean to Finish	2,540	2,533	08/22/2014	4	7	0.28%	7		1	3	3	
Spronk Brothers	Burkhardt	SB1433BHT	Wean to Finish	2,080	2,077	09/02/2014	3	3	0.14%	3			1	2	
Spronk Brothers	Faber	SB1433FAB	Wean to Finish	3,370	3,369	09/05/2014	2	1	0.03%	1				1	
				Total		87,909									

Vengono poi monitorati mensilmente anche altri punti chiave come bio-sicurezza e benessere. Questi settori sono molto importanti, e il sistema Pipestone prevede sessioni di formazione mensili e questionari per il personale d'allevamento. Questo fa sì che la discussione sia sempre aperta e contribuisca a rispondere al meglio a tutte le domande degli allevatori riguardo gli obiettivi di benessere e bio-sicurezza. Per verificare l'efficacia di questi due aree di interesse il sistema Pipestone prevede audit senza preavviso in allevamento. Agli allevamenti e al personale vengono assegnati score in modo oggettivo e sulla base delle loro performance, possono ricevere o meno premi di produzione proporzionali.

Per determinare lo stato di salute o di rischio per la salute vengono valutati diversi aspetti sia in scrofaia che ai siti di ingrasso. Le performance di tutti i programmi realizzati si misurano a livello di sistema Pipestone. Gli aspetti che vengono valutati a livello di sistema Pipestone possono includere: 1) la percentuale di allevamenti di scrofe in uno dei 5 livelli di status per PRRSV, 2) la percentuale di allevamenti di scrofe che svezzano suinetti che sono SIV negativi, 3) la percentuale di scrofaie PEDv positive, 4) l'esito degli audit mensili per la bio-sicurezza e il benessere. Il monitoraggio a questo livello permette di determinare con un certo livello di confidenza se i programmi sanitari, di bio-sicurezza e di benessere stiano funzionando o meno.

Infine grazie alla partecipazione a livello nazionale con diversi programmi tra cui il "Swine Health Monitoring Project" guidato dal Dr. Bob Morrison e Dane Goede della University of Minnesota, il sistema Pipestone e l'industria suinicola nordamericana hanno guadagnato una maggiore accuratezza nel rilevare lo stato di salute dei suini a livello nazionale per malattie come PRRSV e PED.

Figura 2: Swine Health Monitoring Project del dr. Bob Morrison e Dane Goede dell'Università del Minnesota. Il grafico mostra il numero di focolai di PRRSV in allevamenti di scrofe per settimana per gli allevamenti partecipanti.



Questo particolare programma è volontario e i partecipanti riferiscono settimanalmente eventuali cambiamenti dello status sanitario delle rispettive aziende. Il Swine Health Monitoring Project include circa il 30% degli allevamenti di scrofe a livello nazionale. La Figura 2 ne mostra alcuni risultati, e in particolare rappresenta il numero di focolai di PRRS per settimana nelle scrofaie solo per i partecipanti al programma in USA. La linea rossa rappresenta la soglia oltre la quale il focolaio è epidemico. La partecipazione del sistema Pipestone in questo programma ha permesso di: 1) essere a conoscenza dello stato del settore, 2) confrontarsi con gli altri produttori e cercare di misurare oggettivamente il successo o il fallimento dei nostri programmi di prevenzione sanitaria, rispetto agli altri sistemi di produzione.

Monitorare settori sanitari chiave per migliorare le prestazioni a “Pipestone” ha portato a performance complessive migliori e ad aspettative migliori per il sistema Pipestone. Questi punti chiave includono parametri biologici, stato sanitario e attitudine degli operatori. I settori chiave per la valutazione sanitaria dovrebbero essere confrontati all’interno dell’unità di produzione stessa, nell’ambito del Sistema Pipestone e, infine, rispetto all’industria suinicola in generale. Per avere un miglioramento che sia misurabile è importante stabilire adeguate politiche, applicare correttamente tali politiche e poi valutarne l’efficacia misurandola prima all’interno e poi all’esterno.

ATTI DEL XLI MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**ASPETTI GESTIONALI ALIMENTARI E SANITARI
DEL SUINO IN ACCRESCIMENTO**

Montichiari (BS), 19-20 Marzo 2015

UN BUON INIZIO CON I SUINI SVEZZATI: NON RALLENTARLI, MA INDICARGLI LA GIUSTA STRADA!

DR. KEES SCHEEPENS
DVM PHD

Il suino è l'animale d'allevamento più intelligente al mondo! Circa 40000 anni fa il suino è stato addomesticato ed ha iniziato a vivere a stretto contatto con l'uomo. Il suino selvatico è un animale agile e robusto con due picchi di attività giornalieri e tra questi due periodi, uno di riposo. I suini selvatici e domestici mostrano comportamenti simili, dal momento che è stato osservato che suini addomesticati che si inselvaticiscono assumono lo stesso repertorio comportamentale di quelli selvatici.

I suini selvatici sono onnivori! Dobbiamo considerare questo aspetto quando prepariamo le razioni alimentari del suino. I suini selvatici amano anche cacciare e grufolare! Soprattutto il grufolamento, ovvero la componente esplorativa del repertorio comportamentale, dovrebbe essere sempre presa in considerazione per il suino allevato. La ricerca del cibo nei suini selvatici è un comportamento sociale, dato che l'intero gruppo inizia a cercare cibo nello stesso momento. Questa ricerca può occupare 7 ore al giorno o più. In questo lasso di tempo i cinghiali possono camminare per più di 50 km e raggiungere velocità superiori a 65 km/h. Quando trovano il cibo lo mangiano in gruppo.

La gerarchia sociale in un gruppo fa anch'essa parte della normale vita del suino selvatico. Tutti i suini devono aspettare che il leader abbia mangiato a sufficienza. Questa gerarchia sociale è presente anche nei suini domestici ed è veramente importante per creare un ordine in un gruppo di suini. Unire i suini va quindi evitato il più possibile. Quando i suini vengono raggruppati ci sono molte interazioni aggressive che portano ad un elevato livello di stress. Un effetto concomitante è il trasferimento di batteri e virus che può portare a focolai di malattie (APP/S. *suis*). Questo a sua volta può portare ad un aumento dell'utilizzo di antibiotici.

Tenere insieme le nidiare. Specialmente dopo lo svezzamento si raccomanda di non unire suini provenienti da nidiare differenti, ma di tenere insieme le nidiare. In molti allevamenti tedeschi viene utilizzato un sistema cosiddetto *combi-pen*. In questa stanza, dopo lo svezzamento viene spostata solo la scrofa. I suinetti stanno nella stessa stanza fino al peso di circa 25 kg. Il maggior vantaggio è che i suinetti si conoscono già tra loro, e sanno anche dove trovare il cibo, l'acqua ed il tappetino riscaldante.

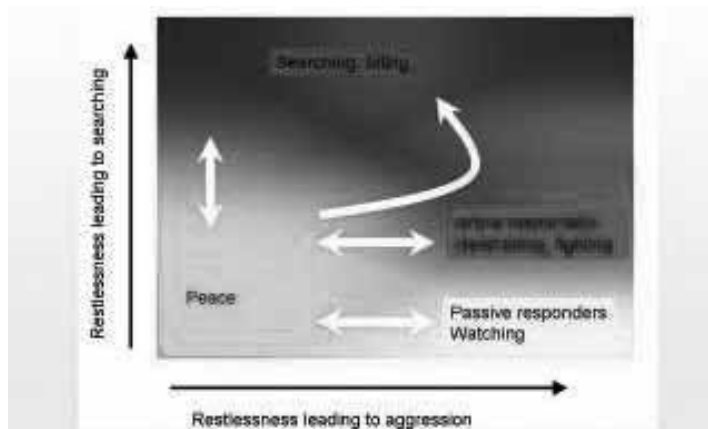
I suini portati allo svezzamento con un minimo stress crescono meglio, hanno meno problemi intestinali e l'utilizzo di antibiotici viene ridotto al minimo.

I suini comunicano tra loro. I cinghiali non hanno nessun problema con paludi, fiumi o canali. Possono nuotare come un atleta olimpico! Per trovare il cibo nel fitto sottobosco i cinghiali hanno sviluppato un sistema di informazione vocale molto sofisticato per rimanere a stretto contatto con gli altri membri del gruppo. Il loro linguaggio consiste in circa 40 differenti richiami per passarsi le informazioni. Una radio con un volume alto, oppure un ventilatore nelle stanze parto possono disturbare questo delicato trasferimento di informazioni!

Arricchimento ambientale. Per i suini è assolutamente necessario avere la possibilità di esplorare e controllare l'ambiente. Questa possibilità dev'essere presente anche negli ambienti di allevamento e anche in condizioni di stress. In condizioni stressanti i suini ritornano infatti ad applicare strategie e comportamentali basilari come farebbero in natura per superare uno stress.

La morsicatura della coda è un esempio di questa strategia comportamentale, nel momento in cui i suini cercano di abbassare il loro livello di stress mediante un redirectionamento del comportamento esplorativo. Stanno cercando di trovare conforto attraverso la morsicatura della coda! Quando i suini vivono in un ambiente che non gli offre distrazioni, possono manifestare un comportamento anomalo ed in molti casi distruttivo (Fig. 1).

Fig 1. Schemi comportamentali di suini in condizioni normali oppure anomale.



Fattori che portano al morsicamento della coda. Correnti di aria fredda, infestazioni parassitarie, un'elevata densità di animali, mancanza di acqua o cibo, mancanza di materiale di arricchimento ambientale possono portare ad un elevato livello di stress nei suini. In questo modo, il loro normale comportamento esplorativo può rivolgersi ai propri compagni, che non vengono più visti come suini ma come un oggetto da esplorare! La morsicatura della coda è un esempio di quello che viene definito ridirezionamento del comportamento esplorativo.

Interrompere comportamenti di morsicatura della coda. La morsicatura della coda può essere interrotta solamente quando non è ancora presente emorragia! E' comunque importante riconoscere il prima possibile i segni di un'aumentata attività di esplorazione nei confronti dei compagni di box. In particolare le femmine iniziano a mordere molto velocemente! La morsicatura della coda può peggiorare in pochi giorni fino a forme estreme di cannibalismo. La morsicatura della coda ed il cannibalismo sono spesso erroneamente considerate come espressioni di un comportamento aggressivo. Ai suinetti piace il sapore del sangue, nello spettro di sapore del sangue c'è una sostanza che porta il cosiddetto sapore 'umami' che è molto apprezzato dai suini.

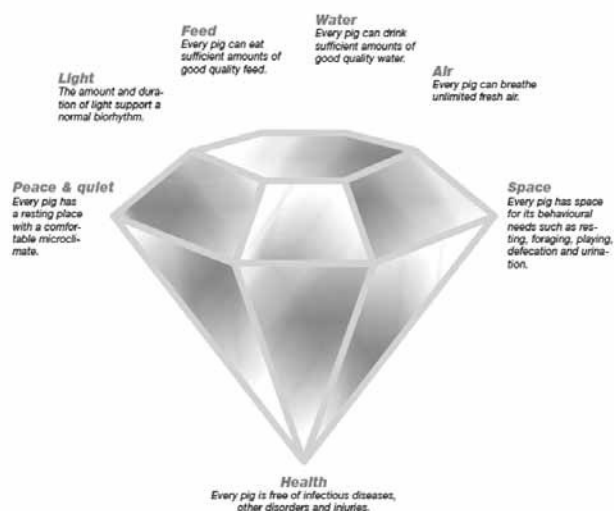
Il controllo della morsicatura della coda può essere raggiunto solo mediante arricchimento ambientale, ad esempio con 20 grammi al giorno di paglia tritata. Due volte al giorno, oppure fornendo ai suini carta, che non intasi i canali di scolo. Quando vengono forniti questi arricchimenti, le possibili cause ambientali della morsicatura della coda scompaiono.

Gurada-pensa-agisci. Per allevare con successo i suini è importante non farsi accecare dalla routine. Nel concetto 'segnali del suino' questo significa che ogni giorno bisogna farsi tre domande basilari:

Cosa vedo? Perché accade? Cosa posso fare?

I suini possono avere performance migliori in condizioni ottimali, con uno stress minimo e una buona gestione dell'allevamento. Allevare i suini in modo adeguato inizia con una buona capacità di osservazione e un elevato livello di conoscenza del comportamento suino. Un allevatore, un veterinario o un consulente di successo devono essere capaci di osservare e interpretare correttamente gli schemi comportamentali di ogni singolo suino. I suini mostrano molto bene come stanno e se crescono bene o no! Un pratico strumento per non dimenticare l'aspetto principale delle sfaccettature ambientali è il cosiddetto "Pig Signals Diamond", (fig.2) che raffigura gli aspetti principali da considerare per il benessere dei suini. L'animale da allevamento più intelligente al mondo lo merita!

Fig. 2 Pig Signals Diamond (pace e quiete: ogni suino ha un posto dove riposarsi con un microclima confortevole; luce: la quantità e la durata della luce devono essere conformi a un normale bioritmo; alimentazione: ogni suino mangia una quantità sufficiente di cibo di buona qualità; acqua: ogni suino può bere una quantità sufficiente di acqua di buona qualità; aria: ogni suino può respirare una quantità illimitata di aria fresca; spazio: ogni suino ha spazio sufficiente per manifestare la sua gamma comportamentale, come riposarsi, cercare cibo, giocare, defecare e urinare).



ANALISI DEI FATTORI DI RISCHIO DI NATURA NON-INFETTIVA E DEI PARAMETRI AMBIENTALI CHE INFLUENZANO L'ESPRESSIONE DELLE PRINCIPALI PATOLOGIE DEL SUINO IN ACCRESCIMENTO L'ESPERIENZA FRANCESE

SILVIA TURCI

*Medico Veterinario alla SELAS Breizhpig, Rue Guynemer, 22190 Plérin (France)
s.turci@breizhpig.com*

INTRODUZIONE

L'analisi retrospettiva delle condizioni di produzione degli animali d'allevamento mostra una considerevole evoluzione nel corso degli ultimi decenni.

Se da una parte i numerosi spostamenti a carattere commerciale degli animali hanno contribuito ad aumentare il rischio di diffusione degli agenti infettivi sul territorio, dall'altra lo sviluppo dell'allevamento intensivo ha portato alla nascita di unità produttive sempre più grandi, con un numero maggiore di capi. Di conseguenza, l'intensivizzazione ha permesso sì di incrementare i risultati produttivi, ma allo stesso tempo ha esposto gli animali a diverse problematiche di natura igienico-sanitaria. Altro fattore "aggravante", la selezione dell'animale che, condotta esclusivamente sulla base delle capacità produttive, ha progressivamente diminuito le sue capacità di risposta nei confronti degli agenti "stressanti", amplificando di conseguenza l'impatto dei microrganismi patogeni già potenzialmente presenti in ambito aziendale.

Inoltre, da quando in Francia i grandi problemi sanitari che hanno dato origine ai regolamenti di polizia veterinaria (come la Peste Suina Classica, l'Afta epizootica o ancora la Malattia di Aujeszky) sono stati eradicati, altre patologie (tali quella respiratoria e digestiva) hanno preso sempre più il sopravvento e sono riuscite ad insediarsi in maniera più o meno permanente, spesso facilitate da condizioni di allevamento cosiddette "favorevoli".

Nel maiale infatti, l'apparato respiratorio, ma anche quello digestivo, sono spesso sede di manifestazioni patologiche che appaiono anche in risposta alle condizioni di allevamento intensivo ed alle pratiche ad esso legate.

A questo proposito è quindi utile ricordare una celebre frase di Louis Pasteur : « le microbe n'est rien, le terrain est tout » (il microbo non è niente, il terreno è tutto) che illustra bene come il potere patogeno di un germe si esprime, o meno, in funzione delle condizioni in cui esso si trova. E' stato dimostrato infatti che la natura e le caratteristiche delle principali patologie del maiale sono in relazione diretta con quella degli agenti patogeni presenti, ma la gravità con la quale questi possono esprimersi risulta da un'equazione complessa nella quale le nozioni di pressione di infezione o di omogeneità dello statuto immunitario degli individui nei riguardi dei patogeni incriminati hanno un'importanza fondamentale.

In tutto questo discorso l'ambiente in cui vivono gli animali gioca un ruolo maggiore.

Scopo del presente lavoro è quindi descrivere quei parametri di natura non infettiva e ambientali che contribuiscono alla persistenza delle malattie respiratorie e digestive nel suino in accrescimento.

PARAMETRI NON INFETTIVI CHE CONDIZIONANO LA PERSISTENZA DELLE MALATTIE RESPIRATORIE

Ad stato attuale le patologie respiratorie rappresentano una delle preoccupazioni sanitarie maggiori per tutti i Paesi che allevano maiali in modo intensivo.

L'elaborazione di programmi di prevenzione nei confronti di queste malattie richiede innanzitutto la conoscenza e l'identificazione di tutti i parametri che sono coinvolti nel loro sviluppo all'interno di un allevamento, ma anche quelli in grado di condizionare la loro espressione clinica in forme più o meno gravi.

Il determinismo delle patologie respiratorie è complesso e dipende a sua volta da diversi fattori di natura infettiva e non. Questi ultimi, legati all'ambiente in cui vivono gli animali, influenzano l'espressione e lo sviluppo delle patologie respiratorie poiché esercitano non soltanto un'azione diretta sugli agenti patogeni (e quindi sulla pressione infettiva), ma anche sugli animali stessi, contribuendo ad alterare le loro difese naturali (fisiche ed immunitarie) e rendendoli quindi più suscettibili alle infezioni (Gonyou *et al.*, 2006)

Nell'allevamento intensivo, diversi fattori legati all'ambiente in cui vivono i maiali possono interferire col delicato equilibrio che esiste tra la popolazione di microorganismi potenzialmente patogeni e la capacità degli animali a far fronte alle infezioni.

Numerose indagini analitiche sono state condotte allo scopo di identificare i fattori di rischio di natura non infettiva che contribuiscono al mantenimento delle lesioni di polmonite e pleurite (Fablet, 2009).

Tra questi fattori si possono elencare quelli legati:

- alla taglia dell'allevamento;
- al tipo di allevamento (ciclo aperto / chiuso, ...);
- alle pratiche di gestione (densità, condotta in tutto pieno/tutto vuoto, pratiche di mescolamento, ...);
- alle caratteristiche strutturali degli edifici in cui alloggiano gli animali (taglia dei box, dimensioni delle sale, sistema di eliminazione dei liquami, sistema di ventilazione, ...);
- ai parametri ambientali (temperatura, igrometria, gas, polveri e bioaerosol, stagione).

Tuttavia, un approccio che mettesse in relazione la valutazione oggettiva delle condizioni climatiche interne (misurate attraverso delle sonde che permettono di rilevare i parametri di interesse) e i fattori di rischio di natura non infettiva partendo da un campione costituito da un numero significativo di allevamenti era raramente stato realizzato.

L'équipe dell'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail) di Ploufragan ha condotto un interessante studio epidemiologico allo scopo di identificare e quantificare l'effetto dei parametri non infettivi sulle lesioni di polmonite e pleurite in maiali provenienti da allevamenti a ciclo chiuso localizzati nell'Ovest della Francia (Fablet *et al.*, 2012).

Questo lavoro merita di essere descritto qui di seguito in maniera più dettagliata (Fablet *et al.*, 2012).

MATERIALI E METODI

Tra Novembre 2006 e Febbraio 2008, un'indagine trasversale è stata realizzata in 143 allevamenti di maiali a ciclo chiuso localizzati nell'Ovest della Francia (Bretagna, Normandia e Paesi della Loira) selezionati a partire da una banca dati realizzata sulla base della presunta gravità delle lesioni polmonari con la collaborazione delle differenti Organizzazioni di produttori che intervengono sul territorio.

Raccolta dei dati

In ognuno di questi 143 allevamenti un'équipe dell'ANSES ha organizzato una visita d'allevamento, con lo scopo di raccogliere tutte le informazioni relative ai fattori di rischio potenzialmente favorevoli le patologie respiratorie. Tutte le pratiche relative alla condotta

dell'allevamento sono state annotate in un questionario,, compilato insieme all'allevatore. Allo stesso tempo, in maternità, post-svezzamento e ingrasso sono state effettuate delle misure e delle osservazioni degli animali e delle condizioni di allevamento.

Misura dei parametri ambientali interni

I parametri ambientali sono stati misurati in una sala in cui si trovavano i maiali a fine ingrasso, ma anche nella sala di post-svezzamento che, a sua volta, aveva accolto questi stessi animali. La concentrazione in ammoniaca della sala è stata misurata il giorno della visita (dalle 8 alle 9.30) attraverso una sonda elettrochimica (Safecheck 100, QUEST Technologies, Fontenay sous bois, France). Inoltre, la temperatura, l'umidità relativa e la concentrazione di CO₂ sono state registrate (Testo 435-2 sonde IAQ, Testo, Lenzkirch, Germany) costantemente per 20 ore a partire dalle 16.00 del giorno della visita. La temperatura e l'umidità relativa sono state registrate anche all'esterno della sala, nel corridoio. Anche le polveri respirabili (<5 µm) sono state oggetto di valutazione, per determinazione gravimetrica (TSI Marseille, France) e fotometria (AM510, TSI Marseille, France). Gli apparecchi utilizzati sono stati posizionati in una cassa ad un'altezza di 1,40 m dal suolo e al di sopra di un box posto nel centro della sala.

Valutazione delle lesioni polmonari al macello

Un controllo dei polmoni al macello è stato effettuato da una a tre settimane dopo la visita in allevamento sulla banda di maiali proveniente dalla sala in cui erano stati misurati i parametri ambientali. Per ogni allevamento sono stati recuperati 30 polmoni, scelti in maniera casuale lungo la catena di macellazione e poi sottoposti ad una valutazione macroscopica delle lesioni polmonari. La polmonite è stata valutata utilizzando il sistema di punteggiatura messo a punto da Madec e Kobisch (1982).

Analisi statistiche

Tutti i dati ottenuti in allevamento e al macello sono stati trattati statisticamente.

RISULTATI

L'88,1% degli allevamenti inclusi in questo studio era localizzato in Bretagna.

In totale, 4293 polmoni (di maiali provenienti da 143 allevamenti) sono stati controllati al macello.

Nel 69,1% dei suini è stata evidenziata la presenza di lesioni polmonari, al 17,7% dei polmoni è stato attribuito un punteggio superiore a 7. Il range di variabilità dello score polmonare era compreso tra 0 e 14.

Il 14,4% dei polmoni osservati presentava lesioni di pleurite. Un punteggio di pleurite > 2 è stato osservato nel 40,6% degli allevamenti facenti parte dello studio. La frequenza degli animali con lesioni di pleurite estesa era compresa tra 0 e 36,7%, con una media intra-banda del 2,9% ($\sigma=5,8$).

Fattori di rischio associati alle lesioni di polmonite

L'analisi di questo parametro è stata realizzata su un campione di 131 allevamenti (dal momento che 12 allevamenti che avevano un punteggio elevato di pleurite e con punteggi diversi di polmonite sono stati esclusi dall'analisi per poter ottenere un campione più omogeneo nei confronti della polmonite e per poter mettere in evidenza solo i fattori di rischio strettamente connessi ad essa). Quattro variabili sono state selezionate per l'analisi multivariata finale (tabella 1).

Tabella 1 - Fattori di rischio di natura non infettiva associati a lesioni di polmonite nei maiali in accrescimento. Odds ratio (OR) e intervallo di confidenza (IC) a 95%, modello di regressione logistica multinomiale.

Fattore	Punteggio polmonare medio			
	] 0,5 ; 3,75]		> 3,75	
	OR	IC 95%	OR	IC 95%
Intervallo tra le bande (settimane):				
- ≤ 3	4,5	1,5-13,6	5,9	1,5-23,3
- ≥ 4	1	-	1	-
Provenienza dell'aria in post-svezzamento:				
- dal sottotetto	1	-	1	-
- dall'esterno o dal corridoio	1,7	0,5-6,1	5,1	1,4-18,8
Numero di maiali nella sala di ingrasso:				
- ≤ 90	1	-	1	-
- > 90	4,3	1,6-11,6	3,9	1,2-12,5
Concentrazione media di CO2 in ingrasso (20 ore di registrazione, valore espresso in ppm):				
- ≤ 1600	1	-	1	-
- > 1600	4,2	1,6-11,3	4,9	1,6-15,2

Un intervallo corto tra le bande (≤ 3 settimane), delle sale di ingrasso di grandi dimensioni (> 90 maiali) ed una concentrazione di CO2 elevata aumentano significativamente la probabilità che gli animali abbiano un punteggio medio di polmonite compreso tra 0,5 e 3,75. Oltre ai fattori di rischio sopra citati, anche la provenienza dell'aria in post - svezzamento (dall'esterno o dal corridoio), contribuisce a degradare ulteriormente il punteggio polmonare medio ($> 3,75$).

Fattori di rischio associati alla comparsa di pleurite

L'analisi è stata realizzata su un campione di 143 allevamenti. Sei variabili sono state selezionate per l'analisi multivariata finale (tabella 2).

Tabella 2 - Fattori di rischio di natura non infettiva associati a lesioni di pleurite estesa nei maiali in accrescimento. Odds ratio (OR) e intervallo di confidenza (IC) a 95%.

Fattore di rischio	OR	IC 95%
Taglia dell'allevamento (numero di scrofe)		
- ≤ 200	1	-
- > 200	3,1	1,4 – 6,9
Trattamento insetticida in sala parto:		
- NO	2,7	1,2 – 5,8
- SI	1	-
Età dei suinetti al momento del taglio della coda (giorni):		
- ≤ 1,5	1	-
- > 1,5	2,6	1,2 – 5,7
Età alla castrazione (giorni):		
- ≤ 14	1	-
- > 14	2,7	1,1 – 6,8
Portata di ventilazione in sala parto (°C):		
- ≤ 5	2,7	1,2 – 5,9
- > 5	1	-
Temperatura interna media registrata in ingrasso (misurata durante 20 ore, °C):		
- ≤ 23	3,0	1,3 – 6,8
- > 23	1	-

Una portata di ventilazione corta ($\leq 5^{\circ}\text{C}$) e l'assenza di trattamento insetticida in sala parto, il taglio della coda dopo 1,5 giorni di vita ed una castrazione tardiva (dopo 14 giorni d'età), così come una temperatura media inferiore a 23°C in ingrasso ed un allevamento in cui vi sono più di 200 scrofe aumentano significativamente la probabilità che in una banda di maiali ve ne sia almeno uno con lesioni di pleurite estesa.

DISCUSSIONE

I valori di prevalenza delle lesioni di polmonite e pleurite riscontrati a partire dai polmoni dei suini macellati confermano l'ampia diffusione delle patologie respiratorie di fine ingrasso negli allevamenti francesi. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Leneveu *et al.* nel 2005.

Nonostante sia stato dimostrato come la gestione dell'allevamento in bande sia correlata alla riduzione delle lesioni di polmonite rispetto ad una gestione a flusso continuo (Fablet, 2009), i risultati ottenuti in questo studio mostrano che **un intervallo tra le bande inferiore o uguale a tre settimane** aumenta significativamente la probabilità che i maiali soffrano di problemi polmonari nella fase di ingrasso. L'aumento dell'intervallo tra le bande permette inoltre di ridurre

non solo il numero di bande presenti in allevamento, ma anche gli spostamenti di animali, il che favorisce l'instaurarsi di uno stato immunitario più stabile rispetto ad un sistema gestito a flusso continuo o con un intervallo inter-banda corto. Per di più, un intervallo "lungo" limita il mescolamento di maiali di età diverse e con un bagaglio immunitario ed infettivo altrettanto differente. L'influenza delle **dimensioni delle sale di ingrasso** è stata confermata anche in questo caso (Pointon *et al.*, 1985). Questo parametro interviene infatti nel rischio di trasmissione per via aerogena di certi patogeni (Sorensen *et al.*, 2006): più elevato è il numero di animali presenti in una sala e maggiore è il numero di polveri in sospensione che sono potenzialmente in grado di veicolare determinati agenti patogeni virali e batterici (Banhazi *et al.*, 2008). Allo stesso tempo, in una sala contenente un numero elevato di capi la possibilità di trasmissione di patogeni respiratori tra animali infetti e animali suscettibili è maggiore se comparata ad una sala di piccole dimensioni. Benché il ruolo della ventilazione sulle malattie polmonari sia già stato messo in evidenza in precedenti studi (Fablet, 2009), l'indagine condotta dall'équipe dell'ANSES ha permesso per la prima volta di stabilire in che misura il modo in cui **l'aria entra nelle sale di post-svezzamento** può influire sull'apparizione delle lesioni polmonari. L'aria proveniente dall'esterno che viene introdotta in una sala senza essere riscaldata non solo espone i maiali a delle correnti d'aria fredda, ma in più lo stress termico a cui sono sottoposti gli animali influisce negativamente sulla loro risposta immunitaria riducendo così la loro capacità a far fronte alle infezioni (Merlot, 2004). Per quanto riguarda le pleuriti, sembrerebbe che la loro presenza sia correlata all'introduzione in allevamento di grandi lotti di animali associata all'aumento della frequenza di approvvigionamento, oltre ad un sistema di allevamento gestito a flusso continuo, spesso tipico degli **allevamenti di grossa taglia** (Gardner *et al.*, 2002).

L'assenza di trattamento insetticida in sala parto è anch'esso elemento comune agli allevamenti con lesioni di pleurite. La spiegazione potrebbe essere dovuta al fatto che gli insetti fungono da vettori meccanici per determinati agenti patogeni e favorire in questo modo la loro trasmissione intra e inter-allevamento (Amass e Clark, 1999). Nonostante il contatto diretto tra maiali sia considerato la via di trasmissione principale dei patogeni respiratori, un trattamento insetticida fatto regolarmente contribuisce indirettamente a ridurre la frequenza di esposizione degli animali ai patogeni. **Gli interventi tardivi sui suinetti in sala parto (come la castrazione ed il taglio delle code)** sono per la prima volta citati tra i fattori di rischio che favoriscono l'apparizione della patologia polmonare. Questi ultimi infatti, oltre a provocare nell'animale uno stress di natura fisica, danno origine a ferite più estese che fungono da porta di entrata ai diversi microorganismi (Marchant-Forde *et al.*, 2009), rendendo così gli animali potenzialmente più suscettibili alle infezioni concomitanti.

Anche la **portata di ventilazione corta in maternità** è correlata alla presenza di pleurite. Questo infatti fa sì che il ventilatore passi rapidamente dalla velocità minima alla massima, sottoponendo transitoriamente gli animali a correnti d'aria fredda. A ciò si aggiunge lo stress termico subito dagli animali che influisce anch'esso negativamente sulla loro capacità di resistere alle infezioni (Merlot, 2004). Oltre ai parametri appena descritti, le **condizioni ambientali sfavorevoli in ingrasso** promuovono anch'esse l'apparizione delle patologie polmonari. Le **temperature troppo basse** infatti intervengono direttamente sull'apparato respiratorio dell'animale rendendo più difficile l'eliminazione dei microorganismi presenti. Una **concentrazione elevata di CO₂**, spesso riscontrata in presenza di sotto ventilazione e correlata a concentrazioni elevate di bio-aereosol e gas (Banhazi *et al.*, 2004) sembra essere un parametro che influisce indirettamente sulla presenza di malattie polmonari.

CONCLUSIONE

In base ai risultati di questo studio, l'applicazione di pratiche d'allevamento adeguate, il

mantenimento di condizioni igieniche e di stabulazione appropriate (in particolare per quanto riguarda il sistema di ventilazione e l'ambiente all'interno delle sale) risultano essere i fattori di rischio di natura non infettiva significativamente correlati alla riduzione della gravità delle lesioni di polmonite e pleurite sugli animali.

PARAMETRI NON INFETTIVI CHE CONDIZIONANO LA PERSISTENZA DELLE MALATTIE DIGESTIVE

Le patologie digestive costituiscono, al momento, una problematica sanitaria ricorrente nel sistema produttivo nazionale. Anche in questo caso si tratta, per lo più, di sindromi multifattoriali che sono il risultato di un complesso equilibrio tra gli agenti eziologici, i fattori ambientali, i parametri gestionali, ecc... Numerose sono infatti le cause che, agendo contemporaneamente e talora in sinergia, possono alterare questo equilibrio.

Le fasi di magronaggio e ingrasso, tra i vari settori dell'allevamento suinicolo, sono in generale quelle in cui gli animali sembrano essere meno sensibili a problemi direttamente collegabili a condizioni ambientali o sanitarie non ottimali (rispetto, ad esempio a quanto accade durante le fasi di sala parto e post-svezzamento), ma queste, comunque presenti, possono interferire largamente con gli standard produttivi e, in alcuni casi, dare origine a manifestazioni cliniche macroscopiche che si traducono in un elevato danno economico per l'allevatore.

Controllo e prevenzione sono ancora oggi largamente affidati ai presidi antibiotici, considerati una soluzione efficace per contenere il danno derivante dalla mortalità e dalle minori performance produttive (diminuzione dell'incremento ponderale giornaliero ed aumento dell'indice di conversione alimentare, con conseguente aumento dei costi di alimentazione). Questo tipo di soluzione tuttavia non è esente da preoccupanti ricadute, come l'aumento della farmacoresistenza dei microrganismi patogeni e l'impatto economico negativo sul bilancio aziendale.

I fattori predisponenti alla comparsa ed al mantenimento delle patologie digestive del suino in accrescimento non sono, in sostanza, né pochi, né semplici e possono essere classificati in due ordini principali:

1. alimentari;
2. ambientali / gestionali;

Tra i fattori alimentari possiamo elencare:

- **lo stress alimentare:** qualsiasi cambiamento brutale dell'alimentazione può condurre ad un disordine digestivo, ma gli effetti sono, in generale, transitori.
- **Materie prime scarsamente digeribili:** i maiali hanno difficoltà a tollerare tutte le materie prime scarsamente digeribili, soprattutto se somministrate durante le fasi precoci della loro crescita, vale a dire fino a circa 25 Kg di peso vivo.
- **L'apporto di fibra:** in condizioni sperimentali è stato dimostrato che una razione ricca di polisaccaridi non amilacei è correlata alla proliferazione di *B. hyodysenteriae* nel suino adulto (Durmig *et al.*, 1998).
- **Effetto dell'utilizzo dei nuovi cereali:** molti allevatori e molti veterinari conoscono perfettamente le conseguenze dell'utilizzo di cereali tra le 2-3 settimane successive alla raccolta e che sono all'origine dell'apparizione di disturbi digestivi che talvolta possono portare alla morte di alcuni animali. La spiegazione più plausibile è che questi cereali contengono componenti che favoriscono le fermentazioni batteriche anormali nell'intestino.
- **La granulometria:** una dieta a base di particelle alimentari finemente macinate (< a 400-500 micron) è uno dei fattori di rischio legato all'insorgenza dell'ulcera gastrica.

- **La presentazione fisica del mangime:** l'alimento pellettato favorisce il consumo di pasti precipitosi, mentre la presentazione in farina, anche con accentuata competizione al truogolo, ostacola naturalmente la sovra-alimentazione da parte di certi soggetti.
- **Il peso allo svezzamento:** un peso inferiore a 7,2 Kg in suinetti di 28 giorni di vita è un parametro che favorisce la patologia digestiva (Madec *et al.*, 1998).
- **La quantità di mangime ingerita dai suinetti nella prima settimana post-svezzamento:** una quantità di mangime inferiore a 1 Kg / suinetto svezzato è correlata all'apparizione di problemi digestivi rispetto a dei maialini che arrivano a consumare da 1,36 a 1,72 Kg (Madec *et al.*, 1998).
- **Le condizioni di stoccaggio del mangime (o delle materie prime) e la qualità dell'alimento distribuito:** cattive condizioni di stoccaggio possono comportare l'ossidazione dei grassi presenti nel mangime, oltre a favorire lo sviluppo di micotossine.
- **La presenza di fattori antinutrizionali** (saponine, fitasi, inibitori della tripsina) nelle materie prime può interferire con i processi digestivi.
- **Durata della somministrazione dell'alimento** (razionamento *versus* la somministrazione "*ad libitum*"): se la competizione al truogolo viene riconosciuta come causa predisponente di alcuni disturbi digestivi, come nel caso della Hemorragic Bowel Syndrome (HBS), il razionamento costituisce talvolta un'aggravante. Tuttavia questo discorso meriterebbe di essere trattato a parte, in quanto, soprattutto in alcuni periodi della vita dell'animale, il ricorso al razionamento è necessario per limitare gli episodi di diarrea.

Anche il numero di pasti / giorno, la qualità dell'acqua, il tasso di diluizione della broda e la sua velocità di distribuzione devono essere presi in considerazione quando ci si confronta ad un caso di patologia digestiva.

La maggior parte dei parametri ambientali e gestionali correlati alla comparsa dei disturbi digestivi sono gli stessi che sono stati descritti nella parte dedicata alla patologia respiratoria (Madec *et al.*, 1998), vale a dire:

- tipo di condotta, intervallo tra le bande e mescolamento degli animali;
- condotta in tutto pieno-tutto vuoto e protocollo di lavaggio e disinfezione degli ambienti e dei materiali che vengono in contatto con i maiali;
- numero di animali per box / sala;
- condizioni ambientali interne alle sale (temperatura, igrometria, livelli di NH₃ e CO₂);
- protocollo di derattizzazione e trattamento contro gli insetti.

Oltre a tutti questi fattori, comuni ai disordini digestivi e a quelli respiratori, ve ne sono altri che sono legati alla patologia digestiva in particolare, come, ad esempio, il tipo di pavimentazione (piena, parzialmente piena o grigliato). A questo proposito vi è uno studio (Turci and Lewandowski 2013, dati non pubblicati) che mostra chiaramente come la dinamica d'infezione nei confronti di *L. intracellularis* sia diversa quando i maiali in post-svezzamento sono alloggiati su grigliato rispetto a maiali della stessa età alloggiati su pavimento parzialmente pieno.

Lo studio conferma infatti che l'escrezione di *L. Intracellularis* è più precoce quando i maiali sono allevati su pavimento parzialmente pieno. Nelle quattro bande che sono state oggetto della nostra indagine infatti, l'escrezione fecale di *L. Intracellularis* compare in media 3 settimane prima nei maiali alloggiati su pavimento parzialmente pieno e questo è dovuto al fatto che quest'ultimo aumenta il contatto tra i germi potenzialmente presenti e gli animali e quindi la trasmissione fecale - orale, anche quando la carica batterica iniziale è bassa.

RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare va a Christelle Fablet de l'Unité d'Epidémiologie et de Bien-Etre du porc, ANSES - Laboratoire de Ploufragan per la disponibilità e la gentile collaborazione, nonché per avermi permesso di parlare del suo studio durante questa giornata.

BIBLIOGRAFIA

Amass S.F., Clark L.K. (1999). "Biosecurity considerations for pork production units". *J. Swine Health Prod.*, 7, 217-228.

Banhazi T., Seedorf J., Rutley D.L., Pitchford W.S. (2008). "Identification of risk factors for sub-optimal housing conditions in Australian piggeries: Part 2. Airborne pollutants». *J. Agri. Saf. Health*, 14, 21-39.

Durmic Z., Pethick D.W., Pluske J.R., Hampson D.J. (1998). "Changes in bacterial populations in the colon of pigs fed different sources of dietary fibre, and the development of swine dysentery after experimental infection". *J. of Appl. Microbiol.* 85, 574-582.

Fablet C. (2009). "An overview of the impact of the environment on enzootic respiratory diseases in pigs". In: A. Aland & F. Madec (Eds), *Sustainable animal production*, 269-290. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Fablet C., Dorenlor V., Eono F., Eveno E., Jolly J.P., Portier F., Bidan F., Madec F., Rose N. (2012). "Noninfectious factors associated with pneumonia and pleuritis in slaughtered pigs from 143 farrow-to-finish pig farms". *Prev. Vet. Med.* 104, 271-280.

Gardner I.A., Willeberg P., Mousing J. (2002). "Empirical and theoretical evidence for herd size as a risk factor for swine diseases". *Anim. Health Res. Rev.* 3, 43-55.

Gonyou H.W., Lemay S.P., Zhang Y. (2006). "Effects of the environment on productivity and disease". In: B. Straw, Zimmermann W., D'Allaire S., Taylor D.J. (Eds), *Diseases of Swine*, 9th edition, 1027-1038. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

Leneveu P., Robert N., Keita A., Pagot E., Pommier P., Teissier P. (2005). "Lung lesions in pigs at slaughter: a 2-year epidemiological study in France". *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.*, 3, 259-265.

Madec F., Kobisch M. (1982). «Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir». In: Journées de la recherche Porcine, Paris Février 1982 14, 405-412.

Madec F., Bridoux N., Bounaix S., Jestin A. (1998). "Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors". *Prev Vet Med.* 35(1):53-72.

Marchant-Forde J.N., Lay D.C., Jr., McMunn K.A., Cheng H.W., Pajor E.A., Marchant-Forde R.M. (2009). «Postnatal piglet husbandry practices and well-being: the effects of alternative techniques delivered separately". *J. Anim Sci.*, 87, 1479-1492.

Merlot E. (2004). «Conséquences du stress sur la fonction immunitaire chez les animaux d'élevage». *INRA Prod. Anim.*, 17, 255-264.

on A., Heap P., McCloud P. (1985). "Enzootic pneumonia of pigs in South Australia -factors relating to incidence of disease". *Aust. Vet. J.*, 62, 98-100.

Sorensen V., Jorsal S.E., Mousing J. (2006). "Diseases of the respiratory system". In: B. Straw, W. Zimmermann, S. D'Allaire & D.J. Taylor (Eds), *Diseases of Swine*, 9th edition, 149-177. Iowa State University Press, Ames, Iowa.

ATTI DEL XLI MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**IL SUINO IN ACCRESCIMENTO: IL CONTROLLO
DELLE PATOLOGIE FINO ALL'ERADICAZIONE**

CONTROLLO ED ERADICAZIONE DELLE MALATTIE; ESPERIENZE PERSONALI SU ALCUNE MALATTIE DEL SUINO.

MF DE JONG
DVM PhD

INTRODUZIONE

L'allevamento del suino è cambiato molto rapidamente nei diversi paesi europei negli ultimi 50 anni. Le aziende con pochi animali, allevati in un sistema misto, e con ettari di terreno per la produzione di foraggi, si sono completamente modificati e sono evoluti verso grandi aziende, specializzate in un solo tipo di allevamento con centinaia o migliaia di capi.

Prima e durante questo sviluppo, anche le malattie sono cambiate, e questi cambiamenti ci hanno aiutato a conoscerle meglio e ci hanno influenzato nel nostro lavoro di veterinari. In questo articolo verranno presentate alcune malattie che più mi hanno coinvolto durante la mia esperienza lavorativa al Central Veterinary Institute (CVI) e al Animal Health Service(AHS) durante gli ultimi dieci anni.

Ecto- e endo-parassiti

In passato, i problemi sanitari della suinicoltura erano legati ad una lotta quotidiana agli endo- ed ecto-parassiti, ad alcune malattie batteriche e ad ondate periodiche di patologie quali la peste suina classica, l'afta e la malattia di Aujeszky.

La lotta agli ecto- ed endo- parassiti ha fatto grandi passi avanti, principalmente grazie al passaggio da allevamento outdoor ad allevamento indoor, ma anche al sistema di produzione a lotti, al miglioramento degli standard igienici e al sistema all in/all out. Per gli endoparassiti è ancora importante anche il trattamento per *os*. Con l'utilizzo delle avermectine (ivermectina e doramectina) si sono potuti debellare molti ectoparassiti e tenere a livelli bassi gli endoparassiti. All'AHS si sta portando avanti da vent'anni un programma di eliminazione ed eradicazione della rogna da *S. scabiei suis*. In particolare è in atto un sistema di certificazione di allevamenti da riproduzione e moltiplicatori "*S.scabiei suis-free*", utilizzando come sistema di monitoraggio un test ELISA home-made. Anche per *Ascaris suum* è disponibile oggi un test ELISA, sviluppato presso l'Università di Gent, in Belgio. Per i gradi più alti di infezione (*milkspot* nel fegato) i risultati di questo test anticorpale sono incoraggianti, ma in gradi minori di infezione, le performance del test devono essere migliorate.

L'introduzione dei cosiddetti sistemi di produzione migliorativi del benessere animale e di quelli a produzione biologica, hanno invece rappresentato un passo indietro nella lotta fatta finora a ecto- ed endo- parassiti. L'economia di questi sistemi di produzione dovrà fare i conti con l'utilizzo di antiparassitari, con la disponibilità di antiparassitari efficaci e con la scarsa abitudine di includere gli agenti infestanti nella diagnosi differenziale di alcune sintomatologie.

E. coli

La diarrea neonatale causata da ceppi enterotossici di *E.coli* (EC) nei suinetti è un'importante malattia nell'allevamento suino.

Inizialmente, con l'aiuto della sierologia e della sperimentazione su animali, sono stati selezionati vari ceppi patogeni ed utilizzati per la produzione di vaccini. Gli antigeni capsulare K e somatico O, principalmente presenti in ceppi ETEC, sono (F4) -O149 K88; O8 K88, K88 O147; O157 K88 del (F5) -O8 K99, K99 O9; O64 K99; O101 K99. E (F6) 987P in O9K, O20, O64 e O141. Il meccanismo patogenetico, caratteristico per questi ceppi di

E.coli, è mediato da fattori di adesione F4 (K88ab, ac o ad). Un fattore tossina (LT) influenza poi l'Amp e la variazione a cAmp, che è in grado di modificare l'assorbimento d'acqua nell'intestino, in secrezione, causando diarrea, disidratazione e mortalità. Alcuni ceppi con caratteristiche patogenetiche simili sono stati isolati in vitelli e suini, e contenevano un fattore di adesione differente, F5 (K99). Successivamente sono stati scoperti altri fattori di adesione, come F6 (K987P) e F18ab (ED), F18ac (PWD) e F41.

Il test di agglutinazione su vetrino è un test semplice che si utilizza per lo screening dei fattori di adesione dei ceppi di *EC*, tranne che per F5 e F6 che vengono espressi solo dopo coltura su terreno Minca-Vitalex. Data la difficoltà di espressione di alcune adesine, vengono oggi utilizzati test ELISA, e soprattutto PCR specifiche.

I vaccini che contengono questi specifici ceppi/ specifiche tossine come antigene, evidenziano un buon valore protettivo, quando utilizzati nelle scrofe. I vaccini commerciali devono essere somministrati alla scrofa due volte durante la gravidanza per proteggere i suinetti attraverso gli anticorpi colostrali e nel latte. La mancata assunzione di colostro o i problemi delle fasi iniziali della lattazione nelle scrofe, sono problemi generali dell'allevamento suino attuale, che possono generare ricadute sulla protezione immunitaria a varie malattie che dovrebbero invece essere sotto controllo con la vaccinazione della scrofa.

Vi è un crescente sviluppo di piccoli laboratori veterinari, che affermano di essere in grado di isolare *E.coli*, ma spesso non sono poi in grado di tipizzare ulteriormente i ceppi in sierotipi. Spesso utilizzano una semplice specificazione come ceppo "emolitico". Ma questo non è sufficiente per poter selezionare quali ceppi di *E.coli* possano essere i candidati, ad esempio per la produzione di un potenziale auto-vaccino. La conseguenza è l'inefficacia vaccinale, una mancata protezione e quindi, perdite economiche, il tutto causato da una diagnosi sbagliata o non completa.

Nella diarrea post svezzamento (PWD) sono coinvolti diversi ceppi di *E. coli*, che producono diverse tossine (LH=LT1e LT2, ST=STA e STB e STx2e). Nella PWD la tossina STa si lega ad un guanilil ciclasi, un recettore glicoproteico sul bordo dei villi e delle cellule epiteliali delle cripte intestinali e attiva la guanilato ciclasi, che a sua volta, stimola la produzione di guanosina monofosfato ciclica (cGMP) che induce una secrezione di elettroliti e fluidi.

La composizione della dieta, la quantità alimentare, il sistema di alimentazione, la lunghezza della lattazione, l'alimentazione pre-svezzamento, l'età e il peso allo svezzamento, i regimi alimentari post-svezzamento e la genetica del suino, influenzano il verificarsi di episodi di PWD o ED. Rimane comunque difficile eliminare ceppi patogeni di *E. coli* da un allevamento infetto, ma una stabilizzazione della flora intestinale può aiutare a ridurre fortemente la presenza di ceppi patogeni di *E. coli* in allevamento.

Rinite atrofica

Il nome AR è stato assegnato nel 1830 a una patologia caratterizzata da rinite cronica e disturbi dello sviluppo dei turbinati. Da allora sono stati pubblicati numerosi studi riguardo l'eziopatogenesi della malattia. Nel 1953 il gruppo del dott. Switzer e Ross in Iowa, USA ha riprodotto alcune delle lesioni riscontrate nei suini con AR. Attraverso l'inoculazione intranasale di una coltura risospesa di *Bordetella bronchiseptica*, hanno indotto in suini CD-CD SPF di 3 giorni una forte riduzione dello sviluppo dei turbinati, lesione caratteristica della "AR". Grazie a questo risultato, per decenni si è pensato che *Bordetella* fosse l'unico agente patogeno coinvolto nella malattia. Di conseguenza la maggior parte dei piani diagnostici e di controllo si sono basati sulla diagnosi e l'eliminazione di animali portatori negli allevamenti di riproduttori. Dai piani di monitoraggio però, Bb è risultata presente in praticamente tutti gli allevamenti suini, indipendentemente dalla presenza dei sintomi della AR. Si è quindi

iniziato a ipotizzare il coinvolgimento di un ulteriore agente sconosciuto.

Con l'utilizzo di farmaci e vaccini per Bb, si assisteva a un temporaneo miglioramento, seguito però da ricadute con la comparsa dei tipici sintomi di AR. In alcuni casi, veniva isolata dai suini colpiti *Pasteurella multocida* in coltura pura. Ma, ripetendo il test di Switzer e Ross in suinetti CDCD SPF con una sospensione culturale di Pm, non si ebbero lesioni, o se presenti erano di scarsa entità. Passando da metodo colturale su terreno solido a terreno liquido per 24 ore, le lesioni divennero ripetibili senza o con un pre-trattamento con Bb o acido acetico.

Da questo momento in poi, la rinite atrofica era associata a due agenti eziologici (?), Bb, ToxPm o una combinazione di entrambi.

I tentativi di cambiare il nome della malattia non sono andati a buon fine, ma è stato raggiunto un accordo per utilizzare il nome rinite progressiva atrofica per gli allevamenti in cui era coinvolta l'infezione con ceppi di *P. multocida* produttori di tossina dermo-necrotica (DNT) e rinite atrofica non progressiva per tutte le altre infezioni che causano lesioni del grugno simili alla AR, tra quelle in cui è stata rilevata Bb. Ciononostante, i veterinari e gli allevatori usano spesso l'acronimo "AR", in tutti i casi sospetti, senza ulteriori indagini di laboratorio. Nei Paesi Bassi la lotta contro la AR Progressiva si è concentrata inizialmente sugli allevamenti da riproduzione. Questi allevamenti, quando free da Pm tox non potevano trattare o vaccinare per Bb e Pm tox e venivano controllati clinicamente e batteriologicamente tre volte l'anno per Pm tox. Gli allevamenti infetti sono stati degradati e collocati in un secondo gruppo, dove venivano effettuate terapia e vaccinazioni per mantenere l'infezione e i danni ad un livello basso. Gli allevamenti hanno poi iniziato ad acquistare e introdurre scrofette Pm tox- free; se introdotte in un allevamento positivo, all'introduzione dovevano essere poste in quarantena e vaccinate. Quasi tutti gli allevamenti infetti sono passati da tipologia riproduttori a siti di produzione, e hanno avviato e continuato programmi di terapia e vaccinazione.

Già nei primi anni dopo il primo utilizzo dei vaccini, si è scoperto che alcuni vaccini erano più efficaci nel ridurre i sintomi AR, e questo dato è poi stato dimostrato anche testando i livelli di anticorpi dopo la vaccinazione.

Testando i ceppi di Bb per la presenza di una tossina dermo-necrotica, oltre il 95% dei ceppi suini, testati in uno skintest in cavia, hanno mostrato di poter produrre una tossina simile. Utilizzando ceppi non tossigeni e tossigeni di Bb in suinetti di un settimana d'età SPF (CD-CD) si è scoperto che solo i ceppi tossigeni causavano una forte riduzione dei turbinati nasali. Ripetendo questa prova in suinetti SPF più vecchi, ad esempio di 3, 6, 9, 12 e 16 settimane d'età, si è scoperto che le lesioni dei turbinati non venivano osservate in suinetti di età superiore alle 3 settimane. Questo risultato indicava la "AR" come una malattia del suinetto giovane, e confermava l'utilizzo di uno schema terapeutico in suinetti di 3, 6, 9 e 12 giorni di età.

Ad oggi, gli anticorpi verso Bb vengono rilevati nelle scrofe di quasi tutti gli allevamenti, quindi, in condizioni normali tutti i suinetti possono ricevere anticorpi mediante colostro. I livelli di anticorpi raggiunti possono persistere per le prime 3 settimane a proteggere il suinetto dal danno indotto da Bb. Livelli di anticorpi bassi o nulli sono spesso associati a una mancata assunzione di colostro (anche se la scrofa è stata vaccinata). Questo risultato dimostra che una vaccinazione contro Bb in generale, non è sufficiente per evitare le cosiddette lesioni di AR (da Bb). Un altro motivo per giustificare l'utilizzo della vaccinazione per Bb, potrebbe essere il tentativo di ridurre le lesioni polmonari causate da Bb. Ma su tutti gli allevamenti da riproduzione olandesi (alcune centinaia) nei quali è stato utilizzato un vaccino per Bb, sono state comunque osservate lesioni sospette ai turbinati nei suinetti, probabilmente per la mancata assunzione di colostro. Non sembra quindi utile vaccinare contro Bb in un

allevamento con una normale gestione e normali condizioni climatiche, la vaccinazione per Bb non dovrebbe essere considerata una vaccinazione per AR.

Come per Bb, anche per Pm sono stati infettati suinetti SPF di diverse età fino a 16 settimane di età, per capire fino a quando si osservavano danni a turbinati e al grugno. A differenza di Bb, le lesioni sono state osservate a tutte le età analizzate, e confermato in campo, dove anche scrofette di 7 mesi, certificate, hanno sviluppato "AR". La quantità di tossina di Pm sembra aiutare la colonizzazione e influenzare la gravità delle lesioni. Pm tox induce lo sviluppo di AR (lesioni) anche senza l'aiuto sinergizzante di un'infezione da Bb.

Sono state osservate differenze tra vaccini "AR" nella protezione dai sintomi clinici di AR. Solo con un buon vaccino per Pm tox, possono essere rilevati anticorpi materni in suini fino a quattro mesi di età. Con un sistema di vaccinazione delle scrofe e con un rigoroso sistema di gestione tutto pieno/ tutto vuoto, si è raggiunto un livello basso o l'assenza dell'infezione in scrofette o ingrassi di 5 mesi d'età o più. Ciononostante è stato difficile ridurre al minimo l'infezione con questo protocollo di gestione. L'eliminazione dell'infezione si è ottenuta quando sono state introdotte scrofette free da allevamenti certificati e queste scrofette sono state poste in quarantena e vaccinate all'introduzione, ed è stato applicato un programma di rimonta delle scrofe portatrici. Questi allevamenti hanno raggiunto lo stato free per la maggior parte (> 80%) in 1 a circa 5 anni senza interruzioni nella produzione. Questo tipo di eradicazione può essere consigliato quando non si ha fretta di ottenere suini free. Con l'introduzione del programma di analisi e rimonta delle scrofe portatrici, lo status free da Pm tox si ottiene in circa due anni. Se si vuole debellare l'infezione in poco tempo, si deve invece ricorrere alla macellazione dei capi e alla sanitizzazione/pulizia dell'allevamento infetto. Nel tentativo di eliminare Pm tox è importante anche il controllo della movimentazione di veicoli e persone.

PRRS

Dalla scoperta del virus PRRS in Europa a Lelystad, nel 1999, la PRRS è stata descritta anche negli Stati Uniti e definita come "misteriosa malattia del suino". Nei primi anni dopo l'infezione, in molti allevamenti la circolazione del virus sembrava rallentata o addirittura scomparsa. La ricomparsa molte volte era dovuta all'introduzione di scrofette infette o all'uso di seme infetto. Inoltre sono state dimostrate reinfezioni dovute all'introduzione mediante mezzi di trasporto o di diffusione per via aerea. Col passare degli anni il virus della PRRSV ha mostrato variazioni genetiche di circa 1 a 2% per anno (EU). Le variazioni genetiche e antigeniche del virus possono far sì che la malattia ricompaia in un allevamento infetto per mancata o scarsa cross protezione tra ceppi.

In alcune zone d'Europa è stato possibile creare e mantenere allevamenti free (Svizzera, Austria e in parti della Germania), mediante l'uso di programmi vaccinali, controlli sul seme utilizzato e sistemi di filtraggio dell'aria.

Le discussioni riguardo l'uso dei vaccini sono ancora molteplici. Con l'utilizzo di vaccini vivi ci si interroga sulla durata della persistenza del ceppo vaccinale in allevamento, sulla sicurezza di utilizzo in scrofe gravide, sulla clearance del virus vaccinale, sull'efficacia vaccinale...

In un allevamento positivo per PRRS il primo step dovrebbe essere quello di produrre una popolazione siero-negativa e PCR-negativa di suinetti per le successive fasi di magronaggio e ingrasso. Il passo successivo potrebbe essere il sistema consigliato da Holtkamp Iowa di categorizzazione degli allevamenti mediante analisi sierologica e in PCR. Nel frattempo si dovrebbero migliorare i vaccini.

Una volta raggiunto lo stato free di un allevamento, il problema successivo sarà quello di mantenere quell'allevamento al sicuro da una reinfezione nel tempo.

M. hyo

M. hyo è un comune patogeno dell'allevamento suino. La lotta contro *M. hyo* si è sviluppata in modo diverso nelle diverse aree di produzione suinicola. Alcuni hanno utilizzato il sistema SPF, ad esempio Danimarca e Svizzera, mentre altri hanno investito in miglioramento dei ricoveri, ventilazione e climatizzazione e migliore separazione tra età diverse e dimensioni dei gruppi, come in Olanda e in Germania. Ma dal momento che indagini al macello mostravano ancora la presenza di gravi danni dovuti alle lesioni polmonari, un numero crescente di allevatori, ha deciso utilizzare la vaccinazione. Molti dei produttori di vaccini sostengono che suinetti vaccinati mostreranno un ridotto sviluppo di lesioni da *M. hyo*. La maggior parte dei vaccini non inducono una protezione completa fino alla fine del periodo di ingrasso, ma solo una riduzione delle lesioni polmonari. Le lesioni alla macellazione provoca spesso discussioni tra il produttore e il sito di ingrasso, riguardo la vaccinazione e/o il momento della vaccinazione o sul vaccino utilizzato. Lo schema di eradicazione svizzero, messo a punto dal AHS svizzero, si basa sulla parziale rimonta delle scrofe (tarda gestazione) e sull'allontanamento di tutti i suini fino ai 9 mesi d'età, e trattamento antibiotico sugli animali rimasti. Con una vaccinazione intensiva per *M. hyo* di scrofe, scrofette da rimonta, verri e suinetti, dopo circa due anni di vaccinazioni, *M. hyo* non è stato più rilevato mediante PCR in nidiati di circa 16 settimane di età. Nella linea di macellazione tuttavia le lesioni erano ancora presenti e la PCR era positiva.

Un programma di vaccinazione per *M. hyo* in combinazione con un buon sistema AI/AO, controllo igienico e climatico, può eliminare *M. hyo* da un allevamento di suini e potrebbe essere un'alternativa ai metodi di eradicazione classico.

APP

APP è un batterio associato a malattia respiratoria nei suini. In relazione al sierotipo isolato, la malattia da APP può essere più o meno pericolosa per l'allevamento. Non solo la perdita degli animali costa molto in termini economici, ma durante la macellazione, molte carcasse vengono declassate, perdono valore e l'impianto di macellazione deve spendere più tempo e denaro per il processo di rifilatura, per pulire le carcasse con pleuriti o ascessi polmonari.

È importante sapere quale sierotipo di APP è coinvolto nell'infezione in allevamento, incluso il profilo delle tossine. Ad oggi si conoscono 15 sierotipi e 3 profili delle tossine.

I gruppi di suini infetti da APP necessitano di una terapia antibiotica per evitare mortalità e disturbi della crescita. Oggi l'uso di antibiotici è molto dibattuto, e sposta l'attenzione su una maggiore prevenzione mediante l'uso di vaccini.

L'età di vaccinazione dei suinetti può essere influenzata dall'età alla quale inizia la malattia, ad esempio tardo svezzamento, fase iniziale, intermedia o finale del periodo di ingrasso.

Secondo la nostra esperienza, con una vaccinazione precoce la protezione può subire un crollo nella fase finale dell'ingrasso. Uno spostamento in avanti della vaccinazione può essere utile, ma una terza dose di vaccino può migliorare la situazione.

È poi necessario eliminare i trigger per lo sviluppo dell'infezione da APP. La lista include molti patogeni respiratori come virus: Influenza virus, PRRSV, PCV2, ADV e batteri come *M. hyo*, *H. ps*, *Strepto. s* etc.

Hps

Haemophilus parasuis è batterio che può essere isolato in alcuni allevamenti suini. Se ne conoscono 15 sierotipi e 3 patotipi (severo, blando, debole). Il più conosciuto causa un quadro patologico definito come polisierosite o malattia di Glaesser, ma può essere responsabile anche arterite e encefalite. Negli ultimi anni l'interesse per questo batterio è aumentato:

probabilmente la riduzione nell'utilizzo di antibiotici negli svezzati e nei magroni, fornisce al batterio nuove possibilità di sviluppo. I vaccini sono tornati sul mercato, anche se non si sa con certezza se il ceppo o i due ceppi contenuti nel vaccino (as esempio sierotipo 5 o 4 e 5) siano sufficienti per cross-proteggere nei confronti di altri ceppi di *Hps*.

Circovirus suino tipo 2

PCV2 è il principale agente patogeno coinvolto nella PMWS. Sorprendentemente gli anticorpi vengono rilevati nelle scrofe di allevamenti senza sintomi clinici o patologici. In alcuni allevamenti invece la percentuale di suini con PMWS può variare fino a più del 30% degli animali colpiti. Nella maggior parte dei casi questi suini non sopravvivono. In un nostro precedente studio è stata analizzata l'associazione tra PMWS e linea genetica dei suini. Linee high lean landrace avevano più probabilità di ammalarsi. Mentre dagli incroci con linee di verro Yourkshire, Hampshire, Pietrain o Duroc si è ottenuto un notevole miglioramento.

Dalle indagini svolte nell'ultimo decennio si è scoperto che il virus induce una notevole immunosoppressione, spiegando perché gruppi di suini affetti da Circo2 sono spesso colpiti da altre infezioni, ad esempio da *Brachyspira hyodysenteriae* e *Lawsonia intracellularis*. Si è anche osservata l'associazione con riduzione della fertilità e aumento dei disturbi respiratori. Inizialmente si vaccinavano per PCV2 solo i suinetti, ma poi si è iniziato a comprendere nel piano vaccinale anche le scrofe del sito 1. Il dibattito sulla vaccinazione dei soli suinetti o anche delle scrofe è ancora aperto, soprattutto se si tiene conto della variabilità del titolo anticorpale nelle scrofe, ma anche della possibilità che la protezione sia compromessa dall'inadeguata assunzione di colostro ecc.

PED

Nel 2012 in Cina viene per la prima volta segnalato un coronavirus PED-like ad elevata patogenicità. Nel 2013 e nel 2014 più del 60% degli allevamenti americani sono stati colpiti, con alcuni focolai anche in Canada. Nell'autunno del 2014 il virus è stato rilevato anche in allevamenti da ingrasso in Europa. In Ucraina a novembre 2014 è stato segnalato un focolaio in un allevamento con grave diarrea ed elevata mortalità nei suinetti. Il ceppo coinvolto è risultato altamente correlato con il ceppo patogeno americano. L'Europa, di conseguenza, ha adottato misure di biosicurezza, igiene, disinfezione, trasporto animale simili a quelle descritte dal manuale di gestione della PSC. Purtroppo non v'è obbligo di notifica dei focolai di PED. Ma all'inizio di un focolaio è importante avere uno scambio delle informazioni necessarie per sapere dove sono gli allevamenti colpiti per proteggere gli allevamenti limitrofi e quelli connessi epidemiologicamente.

Al momento non sono molte le pubblicazioni riguardo l'utilizzo e l'efficacia dei vaccini per PED in USA. In caso di infezione con un ceppo a bassa patogenicità, si presenta una sintomatologia diarroica, e in poche settimane l'allevamento torna ad una situazione normale. Nel caso di ceppi ad alta patogenicità la gestione è più complessa. Dalle analisi effettuate in USA è stato dimostrato che le scrofe che erano state infettate con un virus PED a bassa patogenicità hanno protetto i loro suinetti dall'infezione con un ceppo altamente patogeno di PED. Una diffusione attiva di un ceppo a bassa virulenza potrebbe proteggere facilmente dall'infezione e da focolai di PED ad alta patogenicità.

Molte delle informazioni circa le caratteristiche del virus, la sopravvivenza nell'ambiente, i disinfettanti efficaci, su come stimolare l'immunità d'allevamento ed eliminare il virus combinando un booster immunitario, una riduzione dell'escrezione virale, un aumento della biosicurezza interna e delle norme igieniche, potrebbero aiutare l'interruzione del ciclo di PED in allevamento.

EPIDEMIOLOGIA DELLA DISSENTERIA SUINA IN USA E RECENTI RICERCHE RIGUARDO FATTORI DI RISCHIO, ALIMENTAZIONE E TECNICHE DIAGNOSTICHE

ERIC R. BURROUGH
DVM, PhD, Diplomate ACVP

*Department of Veterinary Diagnostic and Production Animal Medicine
College of Veterinary Medicine, Iowa State University, Ames, Iowa, USA*

INTRODUZIONE

La dissenteria suina (SD) è stata descritta in letteratura nei primi anni venti (1), i focolai tipici di SD sono caratterizzati da una diarrea sanguinolenta con presenza di muco, più frequentemente osservati in suini in magronaggio e ingrasso. In alcuni casi, le feci diarroidiche possono contenere filamenti di fibrina e tessuto intestinale, con tassi di morbidità e mortalità elevati, che possono avvicinarsi al 30% (2). Le lesioni macroscopiche sono limitate al cieco e al crasso e comprendono la presenza di abbondante muco nel lume e di sangue, in misura variabile. Microscopicamente, il tessuto del colon di suini colpiti con infezione acuta è caratterizzato da un ispessimento della mucosa, con presenza di muco luminale ed emorragia, necrosi superficiale della mucosa e infiltrazione ed essudazione di neutrofili con numerose spirochete intra-lesione (3). La diagnosi definitiva di SD è tradizionalmente basata sull'isolamento di spirochete fortemente beta-emolitiche dal tessuto del colon o dalle feci di suini colpiti; tuttavia, più di recente, sono stati sviluppati metodi molecolari, come la reazione a catena della polimerasi (PCR) e l'ibridazione in situ (ISH) per dimostrare la presenza di *Brachyspira* spp. nei campioni analizzati (2).

Quadro clinico

Nonostante la SD sia tradizionalmente associata alla presenza di *Brachyspira hyodysenteriae*, recentemente sono stati segnalati in Europa e Nord America casi di una malattia simile alla SD, nei quali è stata isolata una spirocheta fortemente beta-emolitica, non riconducibile a *B. hyodysenteriae* mediante i test biochimici e molecolari. Questi risultati hanno portato alla proposta di due potenziali nuove specie, "*Brachyspira suanatina*" (4) e "*Brachyspira hampsonii*" (5). Infezioni sperimentali hanno confermato che queste potenziali nuove specie possono indurre lesioni e/o sintomatologie indistinguibili dall'infezione con *B. hyodysenteriae* nel modello topo (6) e in suini (4,7,8). Questi risultati indicano che la SD può effettivamente verificarsi anche a seguito di un'infezione con *Brachyspira* spp. fortemente beta-emolitiche, non riconducibili a *B. hyodysenteriae* con i comuni metodi di laboratorio, e inoltre suggeriscono che la definizione eziologica di SD dovrebbe essere ampliata per includere anche queste potenziali nuove specie.

Epidemiologia e ri-emergenza della SD in USA

Tra il 1970 e il 1990, la SD è stata una delle principali cause di perdite economiche per l'allevamento suino in USA, con una stima di più di 60 milioni di dollari di perdita annua totale. Verso la metà degli anni '90, tuttavia, la prevalenza negli allevamenti americani è scesa a livelli così bassi che la malattia era considerata da molti come un problema ormai marginale per l'industria suina. La scomparsa della SD nel 1990 fu probabilmente dovuta ad una migliore comprensione della malattia, una migliore biosicurezza, e la disponibilità di antibiotici efficaci e correttamente utilizzati in programmi aziendali di controllo della malattia.

A metà degli anni 2000, il laboratorio diagnostico veterinario della Iowa State University riportava un aumento dell'incidenza di casi di SD (9), con una parte di questi casi in suini importati dal midwest degli Stati Uniti per l'ingrasso. Dall'inizio di queste positività, *B. hyodysenteriae* è stato isolato da suini di 13 stati diversi e "*B. hamptonii*" da suini provenienti da 8 diversi stati, questi risultati rivelano una distribuzione capillare di allevamenti infetti negli Stati Uniti. Con l'aumento della sorveglianza per la malattia, in quasi tutte le principali aree di produzione di suini negli Stati Uniti sono stati identificati allevamenti infetti; tuttavia, la ricaduta clinica negli allevamenti infetti è risultata variabile e probabilmente legata a fattori immunitari e all'uso di antibiotici.

Fattori di rischio per SD

L'espressione clinica della SD può essere significativamente influenzata da fattori alimentari (2). Nonostante i pareri in letteratura siano differenti, è generalmente accettato che una dieta altamente digeribile sia associata ad una diminuita espressione clinica della SD a seguito dell'infezione da *B. hyodysenteriae* (10), mentre una dieta ricca di fonti di fibra rapidamente fermentabile possa aumentare l'espressione della malattia (11). Anche diete ricche di inulina sono state associate ad una ridotta espressione della malattia dopo infezione sperimentale con *B. hyodysenteriae* ed è stato ipotizzato che questo effetto sia dovuto ad alterazioni del microbiota del colon (12). Tale ruolo del microbiota nella patogenesi della SD è supportato da studi precedenti, nei quali era richiesta la presenza di vari batteri sinergici per lo sviluppo della SD in suini gnotobiotici (13). È interessante notare che durante il recente periodo di ri-emergenza della SD negli Stati Uniti, ci sia stata una tendenza verso diete contenenti quantità crescenti di sottoprodotti di produzione dell'etanolo, come *distillers dried grains with solubles* (DDGS), che sono una fonte di fibra alimentare insolubile prontamente disponibile. L'utilizzo di una dieta contenente il 30% di DDGS è risultato associato ad un minor tempo di insorgenza di SD e ad una maggiore incidenza complessiva della malattia dopo infezione sperimentale con *B. hyodysenteriae*, rispetto ai suini alimentati con diete contenenti lo 0% di DDGS (14). Inoltre, una tendenza simile, verso una più rapida insorgenza della malattia nei suini alimentati con un 30% DDGS, è stata osservata anche dopo l'infezione con "*B. hamptonii*" (14). Questi risultati suggeriscono ancora che la presenza di fibra nel colon possa aumentare l'espressione della SD, ma non è chiaro quali siano le caratteristiche della fibra (solubile rispetto insolubile e fermentescibilità) richieste. Inoltre si può ipotizzare che le alterazioni della flora batterica del colon associate alle varie diete, possano essere più importanti della sola formulazione della dieta. In generale, questi studi confermano l'importanza della composizione della dieta come fattore di rischio per lo sviluppo di SD e la dieta dovrebbe essere presa in considerazione nelle strategie di gestione della malattia.

I roditori selvatici (topi e ratti) possono veicolare *Brachyspira* spp. nel loro intestino (15) e sono un'importante fonte di potenziale trasmissione di agenti patogeni all'interno e tra allevamenti. Numerose specie di *Brachyspira*, tra cui *B. hyodysenteriae*, sono state isolate da roditori catturati in allevamenti di suini (16), e la derattizzazione continua ad essere parte integrante delle misure di biosicurezza efficaci per il controllo SD. Il ruolo di uccelli acquatici come fonte di trasmissione delle spirochete patogene tra allevamenti è supportato dal recente isolamento di "*B. suanatina*" dalle feci di anatre domestiche in Svezia (4) e di "*B. hamptonii*" dalle feci di uccelli migratori, tra cui oche in Canada (17) e anatre domestiche e oche selvatiche in Spagna (18). Ulteriori confronti genetici di isolati di *Brachyspira* di origine aviaria e da suini da diversi paesi potrebbero essere utili per valutare le omologie di questi isolati.

I reflui dell'allevamento possono rappresentare una fonte di infezione da *Brachyspira*

patogene (19) ed è particolarmente preoccupante in sistemi in cui vengono riciclati e riutilizzati durante le procedure di pulizia in allevamento. Un recente studio negli Stati Uniti ha rivelato che la sopravvivenza di *B. hyodysenteriae* in liquidi reflui è ridotta in presenza di un pH alcalino (> 8.0) e temperature elevate ($> 30^{\circ}\text{C}$)(20).

Approcci diagnostici alle infezioni da *Brachyspira*

In generale, sono due i motivi principali per cui si richiede il test di ricerca di *Brachyspira*: 1) la conferma della malattia clinica in suini in accrescimento e 2) la sorveglianza nei riproduttori e/o delle fonti ambientali in allevamenti a rischio. Quando si scelgono i test diagnostici, vanno considerate sensibilità e specificità dei test selezionati; tuttavia, è essenziale ricordare che sensibilità e specificità analitiche non corrispondono a sensibilità e specificità diagnostiche. La specificità diagnostica si riflette nel valore predittivo positivo di un test, indipendentemente dalla sensibilità e dalla specificità analitica. Allo stesso modo, la sensibilità diagnostica è un riflesso del valore predittivo negativo di un test.

Per la conferma della malattia clinica (suini con tipica diarrea muco emorragica) il rilevamento delle spirochete è semplice e le differenze nel valore predittivo positivo delle varie tecniche di rilevazione (colture in terreni selettivi, PCR specie-specifiche) sono minime; tuttavia, la sensibilità diagnostica è più alta per l'esame colturale, siccome questo test non è limitato per particolari specie di *Brachyspira* e può quindi rilevare anche ceppi nuovi e ceppi atipici. Anche le lesioni macroscopiche e microscopiche in corso di SD sono utili per confermare la malattia clinica. Le lesioni sono limitate a cieco e colon e comprendono edema mesenterico da lieve a moderato del colon spirale, infiammazione della mucosa del colon, abbondante muco luminale, e quantità variabili di sangue. Le lesioni macroscopiche sono visibili all'apice del colon spirale, e campioni freschi di tali lesioni sono utili da prelevare e inviare al laboratorio per l'esame colturale per *Brachyspira*.

Sebbene non richiesto, può essere prelevato anche un campione mediante scraping della mucosa del colon interessata, per l'esame microscopico diretto per la ricerca di spirochete, oppure per l'esame colturale e la PCR. La conferma delle lesioni macroscopiche in istologia è utile per valutare la presenza di altri agenti o sindromi che possono contribuire alla sintomatologia clinica osservata. La dimostrazione di spirochete all'interno delle lesioni viene solitamente effettuata con l'ausilio della impregnazione argentea o della ibridazione in situ (21,22). Il rilevamento di spirochete patogene in campioni clinici è essenziale per una diagnosi definitiva di SD e la capacità di rilevare tali spirochete in campioni clinici dipende in gran parte del campione stesso. L'utilizzo di farmaci riduce di molto la probabilità di isolare spirochete, quindi i campioni per l'esame colturale devono essere ottenuti da animali non sottoposti a terapia, clinicamente infetti. I campioni devono essere mantenuti umidi e refrigerati durante il trasporto. I campioni di tessuto o di raschiato dalla mucosa del colon sono di altissimo valore diagnostico per la rilevazione delle spirochete, seguiti da feci fresche contenenti muco e sangue e tamponi rettali da suini con patologia clinica. Studi recenti suggeriscono inoltre che i campioni di saliva raccolti da box di suini con SD sono un'ulteriore matrice utile per il rilevamento di *Brachyspira* (23).

In molte aree del mondo, i programmi di sorveglianza per SD fanno molto affidamento sulle analisi basate su PCR per *B. hyodysenteriae* dalle feci. La SD può verificarsi anche a seguito dell'infezione da altre specie di *Brachyspira* fortemente beta-emolitiche, e questi modelli basati su PCR specifiche possono dare risultati falsi negativi. Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la sensibilità analitica (cioè la soglia di rilevazione) per il rilevamento *B. hyodysenteriae* è superiore utilizzando l'esame colturale con terreni selettivi rispetto alla PCR sulle feci (24,25). Pertanto, nella sorveglianza della SD, la sensibilità diagnostica del

metodo colturale selettivo dovrebbe essere superiore, non solo a causa delle differenze nella sensibilità analitica rispetto alla PCR, ma anche perché è in grado di rilevare specie nuove o non note SD-associate (come ad esempio “*B. hampsonii*” e “*B. suanatina*”). Infine, dati i problemi di gestione del campione fino al laboratorio, e data la possibile presenza di antibiotici dovuti al trattamento dell’animale, la vitalità delle spirochete può essere compromessa o ridotta, quindi un test eseguito in parallelo al metodo colturale, come la PCR, permette di avere la massima sensibilità diagnostica per la sorveglianza dell’infezione.

Trattamento e controllo della SD

Gli antibiotici comunemente usati per trattare la SD comprendono tiamulina, valnemulina, tilosina, e lincomicina. Di questi, le pleuromutiline (tiamulina e valnemulina) sono tra i più utilizzati, data la frequente presenza di resistenze a tilosina e lincomicina (2). La tiamulina è molto efficace nel trattamento della SD associata a isolati di *Brachyspira spp.*, ed è stata riportata l’eliminazione di *B. hyodysenteriae* dopo un trattamento di almeno 21 giorni con uno 0,006% di tiamulina nell’acqua (26). La risoluzione della diarrea è stata riportata già nelle prime 24 ore dopo un trattamento con uno 0,006% di tiamulina nell’acqua, con spirochete vitali non più rilevabili nelle feci dopo 72 ore dall’inizio del trattamento, in suini infettati sperimentalmente sia con *B. hyodysenteriae* che con “*B. hampsonii*” (27).

Purtroppo, viene però sempre più spesso riportata una resistenza alle pleuromutiline in isolati di *B. hyodysenteriae* da diversi paesi, tra cui Cecoslovacchia (28), Germania (29), Italia (30) e Spagna (31). Inoltre, questa resistenza sembra aumentare nel tempo e nelle allevamenti endemicamente infetti, suggerendo una selezione locale di cloni resistenti. Una recente analisi di isolati italiani suggerisce una diffusione transnazionale di *B. hyodysenteriae* resistente in tutta l’Europa (30). È interessante notare che potrebbe esser presente anche una certa variabilità geografica nello sviluppo della resistenza alle pleuromutiline: recenti studi in Polonia (32) e Giappone (33) riportano sensibilità degli isolati di *B. hyodysenteriae* a tiamulina e valnemulina, diversamente in Svezia (34) non è stata osservata resistenza alla tiamulina, anche se un recente studio ha rilevato un graduale aumento delle MIC della tiamulina nel tempo (35). Allo stesso modo, mentre gli isolati dagli Stati Uniti sono generalmente sensibili alla tiamulina, è stato osservato un lieve aumento della MIC₉₀, tra i valori riportati nel 1990 e quelli riportati nel 2011 (36). Di conseguenza, un uso corretto delle pleuromutiline è importante per limitare l’ulteriore sviluppo di resistenza delle *Brachyspira spp.* in tutto il mondo e la valutazione della MIC è fondamentale prima di iniziare il trattamento.

Con l’emergere di “*B. hampsonii*” in associazione alla SD in Nord America (9), e il suo rilevamento nei suini da Belgio (37) e Germania (38) e negli uccelli acquatici in Spagna (39), si è reso necessario valutare i pattern di sensibilità anche di questi isolati. Una recente indagine su isolati spagnoli di “*B. hampsonii*” da oche e anatre selvatiche ha rivelato che questi isolati sono sensibili a vari antibiotici, tra cui la tiamulina (39). Allo stesso modo, una recente indagine su specie di *Brachyspira* isolate durante la routine diagnostica negli Stati Uniti ha rilevato che “*B. hampsonii*” è sensibile sia a tiamulina che a valnemulina (40). Nonostante questi studi suggeriscono che molti isolati di “*B. hampsonii*” sono ancora sensibili alle pleuromutiline, tali ceppi hanno comunque la potenzialità di sviluppare resistenza nel tempo. Deve quindi essere garantito anche per questi isolati un uso corretto degli antibiotici, con un monitoraggio delle MIC nel tempo.

Le misure di controllo della SD dovrebbero prevedere una terapia antibiotica appropriata e l’eliminazione dei fattori di rischio ambientali attraverso il miglioramento di pulizia e biosicurezza. Anche lo spostamento di animali in terapia in un ambiente pulito e separato può essere utile nell’eliminazione della malattia. Il risanamento ambientale, con la rimozione di

tutto il materiale fecale contaminato è essenziale nelle strutture infette ed è risultato efficace anche un protocollo con lavaggio a pressione, disinfezione, e applicazione di soluzioni concentrate di calce sulle superfici ambientali (41). Il miglioramento della biosicurezza deve prevedere un rigoroso controllo dei roditori, l'isolamento da uccelli acquatici, e una riduzione delle entrate/uscite dall'allevamento di persone e veicoli. Dove possibile, una gestione all-in / all-out limita la diffusione dell'infezione e riduce il rischio di reinfezione nei suini trattati.

RIASSUNTO

Mentre la SD è stata riconosciuta come una malattia specifica dei suini per quasi un secolo, c'è ancora molto da chiarire circa la patogenesi della malattia e il ruolo della dieta e del microbiota del colon nello sviluppo e nell'espressione clinica della malattia. I test diagnostici per *Brachyspira* spp. si sono evoluti velocemente con il continuo sviluppo di strumenti diagnostici e analisi più specifici. I test più recenti possono migliorare la specificità della diagnosi eziologica e rivelano spesso relazioni epidemiologiche interessanti. Tuttavia, la specificità viene spesso ottenuta a costo della sensibilità. I test diagnostici per SD dovrebbero essere in grado di rilevare tutte le spirochete potenzialmente patogene e avere anche una sensibilità sufficiente per rilevare anche bassi livelli di spirochete, come quelli che possono essere escreti da animali portatori con infezione subclinica. Ad oggi la caratteristica comune a tutte le specie di *Brachyspira* associate con SD è la forte beta-emolisi su piastre di agar sangue, con la maggiore beta-emolisi come un indicatore sensibile del potenziale di indurre SD (7). Fino a quando un test molecolare non sarà in grado di identificare i geni di virulenza unici o altri bersagli genetici specifici universalmente presenti nelle spirochete SD-associate, la coltura su terreni selettivi continuerà a essere parte integrante della rilevazione di *Brachyspira* e della diagnosi di SD.

BIBLIOGRAFIA

1. Whiting RA, Doyle LP, Spray RS. Swine dysentery. *Purdue Univ Agric Exp Stn Bull* 1921;257:3-15.
2. Hampson DJ. Brachyspiral colitis In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, et al., eds. *Diseases of swine*. 10th ed. Ames, IA: Wiley-Blackwell, 2012;680 - 696.
3. Glock RD, Harris DL. Swine dysentery. II. Characterization of lesions in pigs inoculated with *Treponema hyodysenteriae* in pure and mixed culture. *Vet Med Small Anim Clin* 1972;67:65-68.
4. Råsbäck T, Jansson DS, Johansson KE, et al. A novel enteropathogenic, strongly haemolytic spirochaete isolated from pig and mallard, provisionally designated '*Brachyspira suanatina*' sp. nov. *Environ Microbiol* 2007;9:983-991.
5. Chander Y, Primus A, Oliveira S, et al. Phenotypic and molecular characterization of a novel strongly hemolytic *Brachyspira* species, provisionally designated "*Brachyspira hampsonii*". *J Vet Diagn Invest* 2012;24:903-910.
6. Burrough ER, Strait EL, Kinyon JM, et al. Comparison of atypical *Brachyspira* spp. clinical isolates and classic strains in a mouse model of swine dysentery. *Vet Microbiol* 2012;160:387-394.
7. Burrough ER, Strait EL, Kinyon JM, et al. Comparative virulence of clinical *Brachyspira* spp. isolates in inoculated pigs. *J Vet Diagn Invest* 2012;24:1025-1034.
8. Rubin JE, Costa MO, Hill JE, et al. Reproduction of mucohaemorrhagic diarrhea and colitis indistinguishable from swine dysentery following experimental inoculation with "*Brachyspira hampsonii*" strain 30446. *PLoS One* 2013;8:e57146.
9. Burrough ER. Swine dysentery - Re-emergence in the United States and Canada.

- Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, UK. 2013;55-56.
10. Siba PM, Pethick DW, Hampson DJ. Pigs experimentally infected with *Serpulina hyodysenteriae* can be protected from developing swine dysentery by feeding them a highly digestible diet. *Epidemiol Infect* 1996;116: 207–216.
 11. Pluske JR, Durmic Z, Pethick DW, et al. Confirmation of the role of rapidly fermentable carbohydrates in the expression of swine dysentery in pigs after experimental infection. *J Nutr* 1998;128:1737-1744.
 12. Hansen CF, Hernández Á., Mansfield J, et al. A high dietary concentration of inulin is necessary to reduce the incidence of swine dysentery in pigs experimentally challenged with *Brachyspira hyodysenteriae*. *Br J Nutr* 2011;106:1506-1513.
 13. Whipp SC, Robinson IM, Harris DL, et al. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. *Infect Immun* 1979;26:1042-1047.
 14. Wilberts BL, Arruda PH, Kinyon JM, et al. Investigation of the impact of increased dietary insoluble fiber through the feeding of distillers dried grains with solubles (DDGS) on the incidence and severity of *Brachyspira*-associated colitis in pigs. *PLoS One* 2014;9:e114741.
 15. Joens LA, Kinyon JM, Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J Clin Microbiol* 1982;15:994-997.
 16. Backhans A, Johansson K, Fellström C. Phenotypic and molecular characterization of *Brachyspira* spp. isolated from wild rodents. *Environ Microbiol Rep* 2010;2:720-727.
 17. Rubin JE, Harms NJ, Fernando C, et al. Isolation and characterization of *Brachyspira* spp. including “*Brachyspira hampsonii*” from lesser snow geese (*Chen caerulescens caerulescens*) in the Canadian arctic. *Microb Ecol* 2013;66:813-822.
 18. Martínez-Lobo FJ, Hidalgo Á., García M, et al. First identification of “*Brachyspira hampsonii*” in wild European waterfowl. *PLoS One* 2013;8:e82626.
 19. Glock RD, Vanderloo KJ, Kinyon JM. Survival of certain pathogenic organisms in swine lagoon effluent. *J Am Vet Med Assoc* 1975;166:273-275.
 20. Schwartz T, Pittman JS, Kinyon JM, Hammer JM. Effect of waste environment on survival of *Brachyspira hyodysenteriae*. Proceedings of the 43rd Annual AASV Meeting, Denver, CO, USA. 2012;85-89.
 21. Boye M, Jensen TK, Møller K, et al. Specific detection of the genus *Serpulina*, *S. hyodysenteriae* and *S. pilosicoli* in porcine intestines by fluorescent rRNA *in situ* hybridization. *Mol Cell Probes* 1998;12:323-330.
 22. Burrough ER, Wilberts BL, Bower LP, et al. Fluorescent *in situ* hybridization for detection of “*Brachyspira hampsonii*” in porcine colonic tissues. *J Vet Diagn Invest* 2013;25:407-412.
 23. Warneke H, Kinyon JM, Burrough ER, et al. Use of oral fluids as a surveillance tool for *Brachyspira* in swine herds. Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, UK. 2013;43.
 24. Råsbäck T, Fellström C, Gunnarsson A, et al. Comparison of culture and biochemical tests with PCR for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli*. *J Microbiol Methods* 2006;66:347-353.
 25. Wilberts BL, Warneke HL, Bower LP, et al. Comparison of culture, polymerase chain reaction, and fluorescent *in situ* hybridization for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and “*Brachyspira hampsonii*” in pig feces. *J Vet Diagn Invest* 2015;27:41-46.
 26. Taylor DJ. Tiamulin in the treatment and prophylaxis of experimental swine dysentery. *Vet Rec* 1980;106:526–528.

27. Wilberts BL, Arruda PH, Warneke HL, et al. Cessation of clinical disease and spirochete shedding after tiamulin treatment in pigs experimentally infected with “*Brachyspira hampsonii*”. *Res Vet Sci* 2014;97:341-347.
28. Šperling D, Smola J, Čížek A. Characterisation of multiresistant *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Czech pig farms. *Vet Rec* 2011;168:215.
29. Rohde J, Kessler M, Baums CG, Amtsberg G. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet Microbiol* 2004;102: 25-32.
30. Rugna G, Bonilauri P, Carra E, et al. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003-2012. *Vet J* 2014; doi:10.1016/j.tvjl.2014.10.033.
31. Hidalgo Á, Carvajal A, Vester B, et al. 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.
32. Zmudzki J, Szczotka A, Nowak A, et al. Antimicrobial susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from 21 Polish farms. *Pol J Vet Sci* 2012;15:259–265.
33. Uezato K, Kinjo E, Adachi Y. In vitro susceptibility of 21 antimicrobial agents to 37 isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* isolated from pigs in Okinawa Prefecture. *J Vet Med Sci* 2004;66:307–309.
34. Karlsson M, Fellström C, Gunnarsson A, et al. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira* (*Serpulina*) species isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:2596–2604.
35. Pringle M, Landén A, Unnerstad HE, et al. Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. *Acta Vet Scand* 2012;54:54.
36. Clothier KA, Kinyon JM, Frana TS, Naberhaus N, Bower L, Strait EL, Schwartz KJ. Species characterization and minimum inhibitory concentration patterns of *Brachyspira* species isolates from swine with clinical disease. *J Vet Diagn Invest* 2011;23:1140-1145.
37. Mahu M, de Jong E, De Pauw N, et al. First isolation of “*Brachyspira hampsonii*” from pigs in Europe. *Vet Rec* 2014;174:47.
38. Rohde J, Habighorst-Blome K, Seehusen F. “*Brachyspira hampsonii*” clade I isolated from Belgian pigs imported to Germany. *Vet Microbiol* 2014;168:432-435.
39. Martínez-Lobo FJ, Hidalgo Á, García M, et al. First identification of “*Brachyspira hampsonii*” in wild European waterfowl. *PLoS One* 2013;8:e82626.
40. Mirajkar NS, Gebhart CJ. Antimicrobial susceptibility patterns of *Brachyspira* species in U.S. swine herds. Proceedings of the 6th International Conference on Colonic Spirochaetal Infections in Animals and Humans, Guildford, UK. 2013;53.
41. Burrough ER, Sexton C. Swine dysentery: Diagnostic criteria and elimination strategies. Proceedings of the 44th Annual AASV Meeting, San Diego, CA, USA. 2013;551–556.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

MONITORAGGIO DELL'EFFICACIA DELLA CASTRAZIONE CHIMICA ED IMMUNOLOGICA DEL VERRO

MONITORING THE EFFICACY OF CHEMICAL AND IMMUNOLOGIC CASTRATION IN BOARS

TONON F.^{1,3}, LUCCARDA S.², STELLETTA C.³, VENCATO J.³, ROMAGNOLI S.³

¹ *Suivet*; ² *Libero professionista*; ³ *Dipartimento MAPS, Università di Padova*

Parole chiave: castrazione immunologica, castrazione chimica, vero, efficacia

Key words: Immunological castration, chemical castration, boar, efficacy

Riassunto

Sono stati valutati gli effetti della somministrazione di deslorelin e di un vaccino contro il GnRH nei verri fino al 120 giorno dopo trattamento. I verri sono stati scelti di età differenti (120, 195, 280 giorni), e suddivisi in tre gruppi di trattamento (Deslorelin, Vaccino, e controllo). Sono stati effettuati due metodi di monitoraggio attraverso l'applicazione del test di stimolo con analogo del GnRH e con la citologia testicolare. I risultati indicano un blocco della funzionalità testicolare nel caso del deslorelin e l'esigenza di integrare il protocollo con ulteriori richiami dopo il 90° giorno dalla seconda dose vaccinale.

Abstract

Effects of deslorelin and a vaccine anti-GnRH were evaluated on boars up to 120 days after treatments. Boars were at different age at the starting time (120, 195 and 280 days) and subdivided in three groups of treatment (Deslorelin, Vaccine, Control). Two monitoring methods were applied using GnRH challenge test and testicular cytological evaluation. Results indicate a testicular functionality block on the case of deslorelin implant while it could be useful to consider subsequent doses after 90 days from the end of anti-GnRH vaccine protocol.

INTRODUZIONE

La castrazione chirurgica rappresenta molto spesso una necessità per garantire al consumatore determinate caratteristiche organolettiche delle carni e dei prodotti a base di carne suina; nonché per agevolare l'allevamento del suino riducendone l'aggressività e il comportamento sessuale nei soggetti maschi. Questa pratica zootecnica a livello europeo è in diminuzione come si evince dalla lettura di due report eseguiti all'interno della UE a pochi anni di distanza (Fredriksen *et al.* 2009; Kallas *et al.* 2013). La spinta per un superamento di questa pratica nasce dall'ormai provato stato di forte stress e dolore (Hay *et al.*, 2003), causato al suinetto da tale metodica. Dal 2009 è in commercio in Europa l'Improvac®, un vaccino in grado di immunizzare i suinetti contro il GnRH endogeno. Il prodotto è costituito da una molecola di GnRH di sintesi senza attività farmacologica, incapace cioè di legarsi ai recettori specifici, coniugata con il tossoide difterico. Il tossoide deriva dalla tossina difterica prodotta da *Corynebacterium Diphtheriae* trattata affinché perda la sua tossicità conservando al contempo la sua immunogenicità. Poiché il titolo anticorpale tende a scendere sotto il livello minimo dopo 6-8 settimane dalla seconda iniezione e di conseguenza si ha una risalita dei livelli di testosterone che indicano una ripresa funzionale del testicolo (Wicks *et al.*, 2013); lo schema vaccinale indicato dalla casa produttrice non è applicabile nell'allevamento del suino pesante (180 kg e 9 mesi di vita circa) caratteristico del nostro paese. Seguendo tale schema infatti il

tempo intercorrente tra la seconda iniezione e la macellazione sarebbe di gran lunga superiore alle 6-8 settimane; anche la possibilità di posticipare la seconda dose vaccinale presenta evidenti difficoltà dovute all'aumento dell'aggressività ed il raggiungimento della maturità sessuale. Risulta opportuno pertanto, prevedere una terza dose vaccinale aggiuntiva per mantenere i livelli anticorpali sopra il livello protettivo come già sperimentato da Bilskis *et al.* (2012).

Il deslorelin è un super agonista del GnRH (Suprelorin®, Virbac) 100 volte più potente del GnRH endogeno; attualmente in commercio per l'induzione temporanea della infertilità maschile nel cane e nel furetto. Il Suprelorin® si presenta come un impianto a lento rilascio da inserire sottocute, disponibile in due concentrazioni: 4.7 mg e 9.4 mg. Il deslorelin agisce provocando l'internalizzazione e la degradazione dei recettori del GnRH presenti nelle cellule gonadotrope dell'ipofisi anteriore (down regulation) senza un aumento compensatorio della loro sintesi. Questo fenomeno è dovuto al continuo stimolo recettoriale provocato dal costante rilascio di deslorelin dall'impianto sottocutaneo che sostituisce il rilascio pulsatile del GnRH ipotalamico. Conseguenza del trattamento con il deslorelin è l'interruzione della funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico tramite la mancata sintesi e secrezione di LH ed FSH a livello ipofisario ed il blocco della spermatogenesi a livello di spermatogoni (Kauffold *et al.*, 2010). L'utilizzo di questo principio attivo nel suino maschio, allo scopo di prevenire l'odore di verro bloccando la produzione di testosterone, è stato sperimentato da Kauffold *et al.* (2010); precedentemente Kopera *et al.* (2008, 2009) avevano condotto degli studi circa le alterazioni morfofunzionali nelle cellule testicolari e l'immunolocalizzazione dei recettori per gli androgeni a livello testicolare ed epididimale in suini trattati con deslorelin. Nel loro studio Kauffold *et al.* hanno impiantato intramuscolarmente con Suprelorin® 4.7mg 5 suini maschi di 5 settimane di vita per valutare gli effetti sulla funzionalità sessuale. La crescita testicolare è stata marcatamente ridotta rispetto ai suini del gruppo controllo e sia la steroidogenesi che la spermatogenesi risultavano sopresse in 4 dei 5 suini a 26 e 27 settimane di vita. Il 5° suino aveva mostrato una ripresa della crescita testicolare a 17 settimane di vita, alti livelli ormonali a 26 e 27 settimane al momento dei prelievi e una ripresa della spermatogenesi a 34 settimane. L'ipotetico vantaggio, derivante dall'utilizzo di questo prodotto, starebbe nella necessità di trattare una sola volta i suinetti anziché le due-tre volte necessarie per l'Improvac; evitando lo stress ed il dolore causati dalla castrazione chirurgica. Scopo del lavoro è stato quello di valutare l'efficacia della castrazione chimica con Deslorelin e immunologica con vaccino anti GnRH attraverso l'applicazione di un metodo integrato di monitoraggio basato sulla risposta allo stimolo con analoghi del GnRH e sulla citologia testicolare.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 9 suini maschi provenienti da allevamenti industriali. L'età ed il peso dei singoli capi all'inizio dell'esperimento erano rispettivamente di: $\approx$ 120d e 50kg per i capi n° 1-4-7; $\approx$ 195d e 100kg per i capi 2-5-8; $\approx$ 280d e 160kg per i capi 3-6-9. I 9 suini sono stati accasati in due box che comprendevano un'area interna ed una più piccola esterna e marchiati sul dorso con un numero identificativo progressivo da 1 a 9. I suini sono stati divisi in tre gruppi di trattamento, ciascuno dei quali composto da un individuo per ognuna delle tre classi di età sopra elencate. Il terzo gruppo, denominato "controllo" non ha ricevuto trattamenti. All'inizio della monitoraggio i gruppi erano così composti: Gruppo 1, deslorelin: n° 1 (120 d), n° 2 (195 d), n° 3 (280 d); Gruppo 2, Improvac: n° 4 (120 d), n° 5 (195 d), n° 6 (280 d); Gruppo 3, controllo: n° 7 (120 d), n° 8 (195 d), n° 9 (280 d). Durante il primo giorno di monitoraggio (d 0) a tutti i suini è stato fatto un test di stimolo

della funzionalità testicolare (GnRH challenge test) consistente nel prelievo di un campione di 5 cc di sangue alla giugulare, la successiva somministrazione di 2 cc di buserelin (Dalmarelin® Fatro), ed un ulteriore prelievo a 60 minuti dalla somministrazione. Al gruppo deslorelin è stato impiantato l'impianto nel sottocute del padiglione auricolare destro. Al gruppo Improvac è stata somministrata la prima delle tre iniezioni previste e nel gruppo controllo si è proceduto con la castrazione chirurgica mediante anestesia sul suino n° 7 lasciando interi i restanti due che sarebbero stati castrati successivamente, permettendoci così di avere nel gruppo controllo dei soggetti con livelli di testosterone fisiologici. Il gruppo Improvac ha ricevuto la seconda dose di vaccino a 1 mese e la terza a 4 mesi. Durante i 5 mesi di monitoraggio si è proceduto alla raccolta di campioni ematici, prelevati alla giugulare mediante vacutainer, con cadenza settimanale nel primo mese e quindicinale nei mesi successivi. Il test di stimolo della funzione testicolare con la buserelina è stato effettuato al t 0 e di seguito con cadenza mensile. A 3 mesi dall'inizio del monitoraggio è stato eseguito su ciascun suino l'esame citologico ago aspirato con ago sottile. Per eseguire la TFNAC un ago butterfly da 21G, collegato ad una siringa da 20ml, è stato inserito nel testicolo e si è raccolto del materiale su più piani spostando la butterfly. Il materiale raccolto è stato strisciato su vetrino, è stato colorato con May-Grunwald Giemsa modificata ed esaminato al microscopio ottico. Per ogni vetrino sono state contate almeno 200 cellule spermatogeniche e 200 cellule del Sertoli. Per ogni campione sono stati calcolati i seguenti dati: frequenza relativa di ogni cellula della spermatogenesi; SI (indice spermatico): percentuale di spermatozoi sul totale delle cellule spermatogeniche; SEI (indice sertoliano): percentuale delle cellule del Sertoli sul totale delle cellule spermatogeniche; SSEI (indice spermatico/sertoliano): percentuale di spermatozoi sulle cellule del Sertoli. I suini numero 8 e 9 sono stati castrati chirurgicamente sotto anestesia al 3 mesi dall'inizio del monitoraggio.

RISULTATI

I risultati dell'andamento della testosteronemia basale sono riportati nei grafici 1 mentre il confronto della risposta al GnRH challenge test viene riportato in grafico 2. In tabella 1 vengono riportati i risultati della citologia testicolare.

Grafico 1. Livelli di testosteronemia basale di suini interi, castrati chimicamente e immunologicamente durante 5 mesi di monitoraggio.

Graphic 1. Basal Testosteronemia levels of immunological, chemical castrated and control boars during 5 months of monitoring.

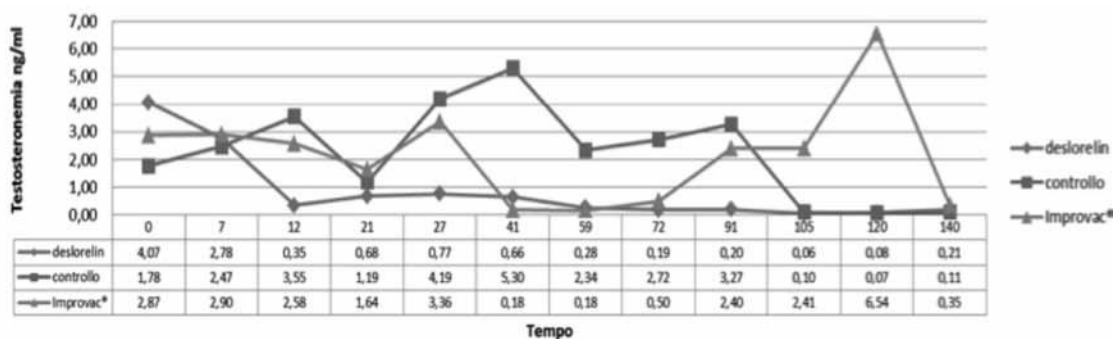


Grafico 2. Confronto della risposta al GnRH challenge test di suini castrati immunologicamente, chimicamente e interi

Graphic 2. Comparison of responses to GnRH challenge test of control, immunological and chemical castrated boars

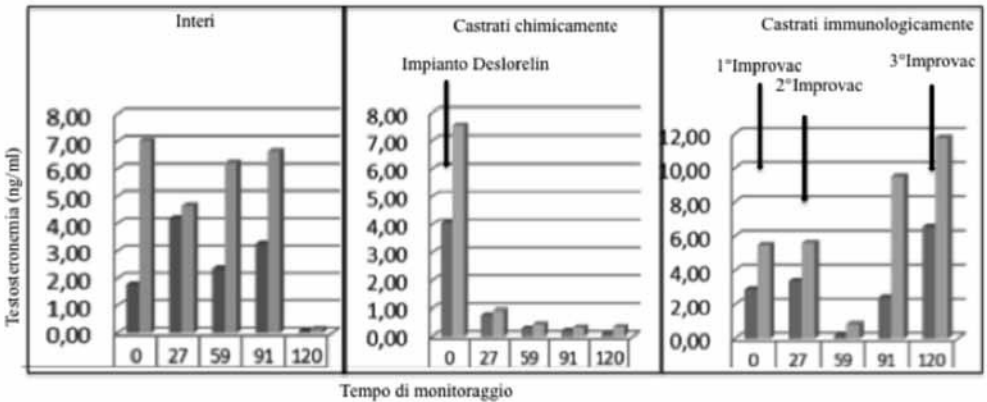


Tabella 1. Valori (media $\pm$ e.s.m.) delle cellule spermatogenetiche nei gruppi di suini interi, castrati immunologicamente e chimicamente.

Trattamenti	Spermatogoni	Spermatociti primari	Spermatociti secondari	Spermatidi ab	Spermatidi cd	SI	SEI	SSEI
Deslorelin	8,71 $\pm$ 2,86	75,12 $\pm$ 10,77 ^a	12,34 $\pm$ 7,36 ^a	2,14 $\pm$ 2,14	1,68 $\pm$ 0,82 ^a	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	1,58 $\pm$ 0,92	0,00 $\pm$ 0,00 ^a
Improvac	5,77 $\pm$ 3,11	21,07 $\pm$ 7,96 ^b	6,41 $\pm$ 3,64 ^{ab}	14,92 $\pm$ 4,22	12,84 $\pm$ 3,32 ^{ab}	38,98 $\pm$ 7,80 ^b	12,32 $\pm$ 3,78	198,58 $\pm$ 58,43 ^{ab}
Controllo	3,11 $\pm$ 0,84	19,07 $\pm$ 3,56 ^b	1,81 $\pm$ 0,36 ^b	15,13 $\pm$ 3,41	14,70 $\pm$ 2,55 ^b	46,18 $\pm$ 3,82 ^b	31,17 $\pm$ 10,05	332,67 $\pm$ 55,73 ^b

Lettere differenti (a,b) indicano una differenza significativa ($P < 0,05$) tra i gruppi.

DISCUSSIONE

I verri 8 e 9 del gruppo controllo presentano una testosteronemia basale variabile ma senza una chiara tendenza all’aumento o alla diminuzione i cui valori medi sono simili a quelli rilevati da altri Autori in suini interi usati come controllo (Kauffold et al., 2010; Lealiifani et al., 2011; Kubale et al., 2013; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008; Wicks et al., 2013). Al 3° mese, i soggetti 8 e 9 sono stati castrati chirurgicamente e si nota un crollo del testosterone ematico a livelli tipici dei soggetti castrati (Kauffold et al., 2010; Turkstra et al., 2011; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008). Per tutta la durata del moniroraggio, ad eccezione dell’inizio, il suino numero 7 mostra una testosteronemia basale coerente con

quella dei soggetti castrati (Kauffold et al., 2010; Turkstra et al., 2011; Dunshea et al., 2001; Zamaratskaia et al., 2008).

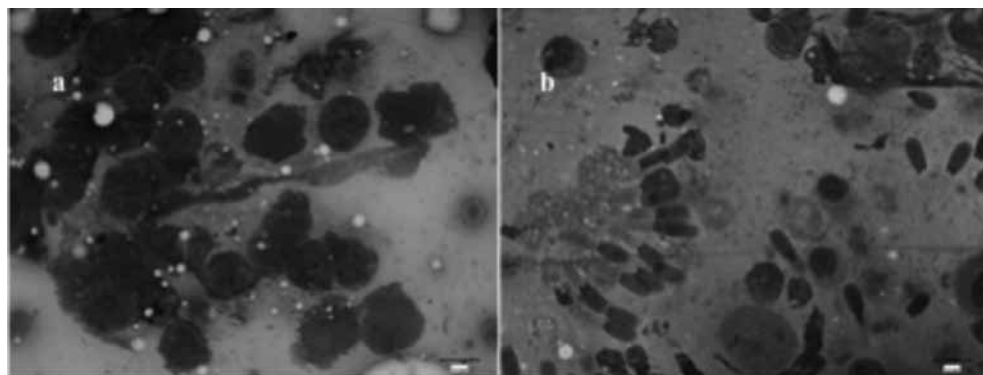
Nel gruppo deslorelin l'andamento della testosteronemia durante il monitoraggio si discosta sensibilmente rispetto al gruppo controllo mostrando un rapido e significativo declino tra 0 e il 12° giorno dove raggiunge un valore medio inferiore ad 1 ng/ml per poi stabilizzarsi per tutto il successivo periodo di monitoraggio. I livelli di testosteronemia basale registrati al 12° giorno al 120° giorno sono simili ai valori riportati da Kauffold et al. (2010). I risultati del test di stimolo nel gruppo deslorelin mostrano a t0 valori analoghi a quelli del gruppo controllo mentre a partire dal test di stimolo effettuato al 27° giorno e per i successivi si nota che la testosteronemia a 60' dalla somministrazione dell'agonista buserelin non supera mai il valore di 1 ng/ml mostrando anzi lievissimi incrementi non significativi indicanti una soppressione della funzionalità testicolare. Il gruppo Improvac® ha ricevuto le tre dosi vaccinali agli 0, 27° e 120°; tra la prima e la seconda somministrazione non si osserva una variazione sensibile della testosteronemia poiché la prima dose ha il compito di sensibilizzare il sistema immunitario ma non stimola una sufficiente produzione di anticorpi anti-GnRH come dimostrato da Zamaratskaia et al. (2008) e Wicks et al. (2013). A partire dalla seconda somministrazione di Improvac® il testosterone diminuisce a livelli comparabili con quelli dei soggetti del gruppo deslorelin e del soggetto castrato del gruppo controllo e si mantengono su tali livelli fino al 72° giorno e si nota successivamente un recupero della funzionalità testicolare evidenziato inoltre dagli elevati valori della testosteronemia dopo il test di stimolo a 91° e al 120° giorno. La soppressione della funzionalità testicolare è dimostrata dal risultato del test di stimolo al 59° giorno in cui la testosteronemia post stimolazione non supera 1 ng/ml. Dopo la terza e ultima somministrazione del vaccino al 120° giorno è stato effettuato un ultimo dosaggio del testosterone basale al 140° giorno dove i valori erano nuovamente scesi, purtroppo però non è stato eseguito nuovamente il test di stimolo per testare la funzionalità testicolare pertanto non possiamo affermare con certezza che la terza dose abbia nuovamente soppresso il testicolo; a riguardo comunque possiamo citare lo studio di Bilskis et al. (2012) che dimostrano come anche la terza somministrazione di Improvac® sia efficace.

L'effetto del trattamento con deslorelin evidenziato in questa analisi citologica, trova somiglianze con i rilievi istologici presenti in letteratura. I suini trattati non maturano sessualmente e non hanno spermatozoi nell'eiaculato, fino alla regressione dell'effetto del farmaco (Kauffold et al., 2010; Kopera, et al., 2008). A livello istologico si notano delle alterazioni a carico dei tubuli e dell'interstizio, variabili in base alla durata del trattamento. In linea generale si nota un arresto maturativo a livello di spermatogoni, quindi sono visibili solo le cellule del Sertoli, gli spermatogoni e pochi spermatociti (Kauffold et al., 2010), e nel caso di trattamenti prolungati (tre mesi) la perdita delle cellule germinali è quasi completa in molti tratti del tubulo (Kopera et al., 2008). Quindi, sia i risultati istologici di questi Autori che i risultati citologici di questo studio rivelano un arresto maturativo (Figura 1).

I suini trattati con Improvac non hanno invece differenze significative rispetto ai suini interi del gruppo controllo. Gli studi istologici in letteratura riportano visibili alterazioni istologiche a livello testicolare: distruzione numerica e morfologica delle cellule del Leydig, e spermatogenesi variabilmente alterata. A livello tubulare i quadri vanno da una leggera distruzione dell'epitelio tubulare (perdita spermatociti e diminuzione degli strati germinativi) ad una grave perdita di cellule germinali (sindrome a sole cellule del Sertoli). Inoltre si nota una drastica diminuzione degli spermatozoi epididimali con un notevole aumento delle alterazioni morfologiche degli stessi. (Einarsson et al., 2009). La vaccinazione precoce aumenta gli effetti distruttivi sulla spermatogenesi, quindi il quadro istologico peggiora: più tubuli sono affetti da grave perdita di cellule germinali, e maggiori sono i tubuli con sindrome

a sole cellule del Sertoli. Tuttavia, fra i vaccinati precocemente, alcuni hanno spermatozoi nell'epididimo, seppur in numero estremamente ridotto e in gran parte malformati (Einarsson, et al., 2011). Questi quadri non sono sovrapponibili a quanto ottenuto nella citologia a causa delle tempistiche con cui è stato effettuato il prelievo citologico, nel nostro studio infatti la vaccinazione è stata eseguita a t0, t27 e t120 quindi la citologia ha fotografato molto probabilmente il momento in cui la funzionalità testicolare era in forte ripresa, come suggeriscono i valori del test di stimolo del gruppo Improvac a t91, in risposta alla probabile caduta del livello anticorpale sotto il livello protettivo. La casa produttrice dell'Improvac® indica la durata della copertura anticorpale in 4-6 settimane mentre Wicks et al. (2013) nella loro pubblicazione indicano in 8 settimane la durata della soppressione della produzione di testosterone, un tempo inferiore ai 74 giorni intercorsi tra la nostra seconda vaccinazione e il prelievo citologico.

Figura 1. Citologia testicolare di verri impiantati con deslorelin (a) di interi (b)



CONCLUSIONI

Il test di stimolo si è dimostrato capace di valutare la soppressione della funzionalità testicolare nei due gruppi di trattamento e il recupero funzionale nei soggetti immunocastrati; la citologia testicolare ha confermato i risultati del test di stimolo nel gruppo deslorelin mentre nel gruppo Improvac®, data la tempistica di esecuzione, ha fotografato la ripresa della spermatogenesi dopo il declino dell'immunità acquisita.

Nell'allevamento del suino pesante, tipico della realtà italiana, i due metodi di castrazione si sono dimostrati efficaci nella soppressione della testosteronemia e della spermatogenesi.

BIBLIOGRAFIA

- Bilskis R., Sutkeviciene N., Riskeviciene V., Januskauskas A., Zilinskas H. (2012) "Effect of active immunization against GnRH on testosterone concentration, libido and sperm quality in mature AI boars". *Acta Vet Scand.* 54, 33.
- Dunshea F.R., Colantoni C., Howard K., McCauley I., Jackson P., Long K.A., Loopaticki 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.
- Einarsson S., Andersson K., Wallgren M., Lundström K., Rodriguez Martinez H. (2009) "Short and long term effects of immunization against gonadotropin releasing hormone, using Improvac TM, on sexual maturity, reproductive organs and sperm morphology in male pigs".

Theriogenology. 71, 302-310.

Einarsson S., Brunius C., Wallgren M., Lundstrom K., Andersson K., Zamaratskaia G., Rodriguez Martinez H. (2011) "Effects of early vaccination with Improvac (R) on the development and function of reproductive organs of male pigs". *Anim Reprod Sci.* 127, 1-2, 50-55.

Fredriksen B., Font I Furnols M., Lundstrom K., Migdal W., Prunier A., Tuytens F.A.M., Bonneau M. (2009) "Practice on castration of piglets in Europe" *Animal.* 3:11, 1480-1487.

Hay M., Vulin A., Gènin S., Sales P., Prunier A. (2003) "Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days". *Appl Anim Behav Sci.* 82, 201-218.

Kallas Z., Gil J.M., Panella-Riera N., Blanch M., Font-i-Furnols M., Chevillon P., De Roest K., Tacken G., Oliver M.A., (2013) "Effect of tasting and information on consumer opinion about pig castration". *Meat Sci.* 95, 242-249.

Kauffold J., Rohrmann H., Boehm J., Wehrend A. (2010) "Effects of long-term treatment with the GnRH agonist deslorelin (Suprelorin®) on sexual function in boars". *Theriogenology.* 74, 733-740.

Kopera I., Tuz R., Hejmej A., Schwarz T., Koczanowski J., Bilinska B. (2009) "Immunolocalization of androgen receptor in the boar epididymis: the effect of GnRH agonist deslorelin". *Reprod Domest Anim.* 44, 266-272.

Kopera I., Tuz R., Kotula-Balak M., Schwarz T., Koczanowski J., Bilinska B. (2008) "Morphofunctional alterations in testicular cells of deslorelin-treated boars: an immunohistochemical study". *J Exp Zool Part A.* 309, 117-126.

Kubale V., Batorek N., Skrlep M., Prunier A., Bonneau M., Fazarinc G., Candek-Potokar M. (2013) "Steroid hormones, boar taint compounds, and reproductive organs in pigs according to the delay between immunocastration and slaughter". *Theriogenology.* 79, 69-80.

Lealiifano A.K., Pluske J.R., Nicholls R.R., Dunshea F.R., Campbell R.G., Hennessy D.P., Miller D.W., Hansen C.F., Mullan B.P. (2011) "Reducing the length of time between harvest and the secondary gonadotropin-releasing factor immunization improves growth performance and clears boar taint compounds in male finishing pigs". *J Anim Sci.* 89, 2782-2792.

Wicks N., Crouch S., Pearl C. A. (2013) "Effects of Improvac and Bopriva on the testicular function of boars ten weeks after immunization". *Anim Reprod Sci.* 142, 149-159.

Zamaratskaia G., Andersson H.K., Ghen G., Andersson K., Madej A., Lundström K. (2008) "Effect of a gonadotropin-releasing hormone vaccine (Improvac™) on steroid hormones, boar taint compounds and performance in entire male pigs". *Reprod Dom Anim.* 43, 351-359.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI ALLILTREMBOLONE PER UN PERIODO RIDOTTO RISPETTO A QUELLO STANDARD SULLA SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO E SULLA FERTILITÀ DI SCROFETTE PUBERI

EFFECT OF ALLYL TREMBOLONE ADMINISTRATION FOR A SHORTER COMPARED A STANDARD PERIOD ON OESTRUS SYNCHRONIZATION AND FERTILITY IN PUBERTAL GILTS

MAZZONI C.¹, SCOLLO A.¹, GHERPELLI M.¹, BONILAUDI P.²,
KIRKWOOD R.³, DE RENSIS F.⁴

¹ Suivet, Reggio Emilia, Italia; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; ³ School of Animal and Veterinary Sciences, University of Adelaide, Australia; ⁴ Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, Italia

Parole chiave: scrofette, alliltrenbolone, PGF2alfa, sincronizzazione estri

Key words: gilt, allyl trenbolone, D-cloprostenol, estrus synchronization, fertility

Riassunto

Per un periodo di 10, 12, 14 o 18 giorni sono stati somministrati a 501 scrofette puberi 20 mg/giorno di Alliltrenbolone per via orale. Negli animali trattati per 10 e 12 giorni, la somministrazione di Allyltrenbolone è stata seguita dalla somministrazione di una doppia dose di 75 µg D-cloprostenolo, un analogo delle PGF2alfa. I risultati di questo studio indicano che, nella scrofetta, il trattamento con Alliltrenbolone per 10 o 12gg, non comporta differenze sulla sincronizzazione degli estri, la fertilità e la prolificità, rispetto alla somministrazione standard per 14 o 18 gg.

Abstract

Allyl trenbolone was administered for 10, 12, 14, or 18 days, at 20 mg per day followed by the administration of 2×75 µg D-cloprostenol at last feeding at 10 or 12 days, to synchronize estrus in gilts. There were no differences in the number of gilts in oestrus, on farrowing rate or subsequent litter sizes.

INTRODUZIONE

Nell'allevamento suinicolo moderno è necessario disporre di un prefissato numero di scrofette pronte settimanalmente per entrare la rimonta interna. Per cui, se non si sincronizzano gli estri, diventa necessario mantenere un numero di scrofette maggiore rispetto a quelle che saranno poi realmente utilizzate. Questo comporta dei costi elevati per l'imprenditore, non solo per il mantenimento degli animali, ma anche per le strutture in più che sono impegnate.

Diversi sono i sistemi per sincronizzare gli estri nella specie suina. Alcuni si basano sull'effetto verro, altri sull'uso delle gonadotropine. Questi sistemi sono in grado di dare una certa sincronizzazione, ma non tale da soddisfare i fabbisogni aziendali della rimonta. Inoltre sono applicabili solo in scrofette prepuberi (Kirkwood, 1999). Nelle scrofette puberi, la sincronizzazione dell'estro è ottenibile attraverso l'utilizzo di un progestinico attivo per via orale, l'Alliltrenbolone (AL). In base al prodotto commerciale ed alla registrazione vigente a livello dei vari paesi europei, il protocollo standard prevede la somministrazione di AL alla dose di 15 o 20mg/giorno per 14 o per 18 gg (Kraeling et al., 1981; Rhodes et al., 1991; Martinat-Botte et al., 1995).

In seguito alla sospensione della somministrazione di AL, il 93 % delle scrofette va in estro

nell'arco di 5-7gg. (Martinat-Botte et al., 1995). Purtroppo non sempre questi risultati sono ripetibili ed il numero di animali che partoriscono non sempre corrisponde alle attese. I motivi di queste differenze non sono chiari. Nella bovina, nella pecora e nella cavalla è stato osservato che una somministrazione di progesterone protratta nel tempo determina una compromissione della secrezione di LH, dello sviluppo follicolare, della qualità degli oociti e, quindi, della fertilità (Lofstedt and Patel, 1989; Sirois et al., 1990; Stock and Fortune, 1993; Kinder et al., 1996; Flynn et al., 2000). Ci sono dati recenti nella specie bovina che mostrano come un trattamento a base di progesterone più breve (5gg) rispetto a uno standard (9gg) sia in grado di migliorare la fertilità (Garcia-Ispuerto et al., 2013). A tutt'oggi, non è dato sapere se una situazione simile si realizzi anche nella specie suina. Va comunque considerato che, nelle scrofette, quando la somministrazione di AL si realizza in un momento casuale del ciclo estrale, alcuni animali potrebbero trovarsi già nella fase luteinica da alcuni giorni. Conseguentemente, la durata dell'effetto sull'attività ovarica del progesterone endogeno seguito poi dal progestinico esogeno può prolungarsi per oltre 20 gg. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto della somministrazione di Alliltrembolone per un periodo di 10 o 12 gg rispetto al periodo standard di 14 o 18 gg sulla fertilità e sulla prolificità delle scrofette.

MATERIALI E METODI

Animali

La prova è stata condotta tra Febbraio 2011 e Gennaio 2013 in un allevamento commerciale di 650 scrofe (PIC Camborough-22), localizzato nella provincia di Parma.

Le scrofette, approssimativamente di un peso di 110 kg ed un'età di 200 gg, sono state messe a contatto con un verro adulto per il rilevamento dell'estro. Rilevato l'estro, le scrofette sono state trasferite in sala gestazione e sono state alimentate a secco con 2kg/giorno di una razione per scrofe formulata per apportare 3.1 kcal/kg e 0.62 % di lisina totale; l'acqua era disponibile *ad libitum*.

Protocollo sperimentale

501 scrofette puberi totali che si trovavano tra i giorni 1 e 19 del ciclo estrale sono state suddivise in quattro gruppi sperimentali sulla base della durata della somministrazione di alliltrembolone:

- Gruppo AL18 (n= 196): 20mg/giorno di AL somministrato per 18 gg consecutivi
- Gruppo AL14 (n=135): 20mg/giorno AL somministrato per 14 gg consecutivi
- Gruppo AL12 (n=97): 20mg/giorno AL somministrato per 12 gg consecutivi e, alla fine del trattamento con AL, sono state effettuate 2 somministrazioni di 75 µg di un analogo della PGF2alfa, il D-cloprostenolo ad un intervallo di 6 ore una dall'altra.
- Gruppo AL10 (n=73): Questo gruppo è stato trattato come il gruppo AL 12 ma la somministrazione di AL è stata effettuata per 10 giorni consecutivi.

L'inizio del trattamento con alliltrembolone è stato definito come il giorno 0 dello studio.

L'alliltrembolone (20 mg/giorno) è stato somministrato a ciascuna scroffetta assieme a una piccola quantità di alimento prima del pasto principale della mattina, al fine di garantirne la corretta assunzione. Per il gruppo AL12 ed AL10, concluso il trattamento con il progestinico, è stato somministrato D-cloprostenolo, per via perivulvare (Kirkwood et al., 1999) in una doppia somministrazione da 75 µg cadauna con un intervallo di 6 ore tra la prima e la seconda. Lo scopo della somministrazione di prostaglandine è stato quello di eliminare qualsiasi struttura luteinica che fosse ancora presente al termine del trattamento con AL per 10 o 12 giorni.

Terminato il trattamento con AL, le scrofette sono state messe in gabbia gestazione e il rilevamento dell'estro è stato effettuato con il verro per due volte al giorno per 10 min. Le scrofette in estro sono state inseminate al momento del rilevamento delle manifestazioni estrali e poi 24 ore più

tardi. Le dosi di seme utilizzate contenevano 2.6×10^9 spermatozoi in 90 ml (extender M-RA). All'estro successivo al trattamento, l'intensità della manifestazione estrale, è stata valutata assegnando un punteggio su una scala da 1 (manifestazioni dell'estro poco evidenti) a 5 (manifestazioni dell'estro molto evidenti). Sono stati registrati la durata dell'estro e l'intervallo tra la sospensione del trattamento e la comparsa dell'estro.

Il tasso di gravidanza è stato calcolato dividendo il numero di scrofette inseminate che hanno partorito per il numero totale di scrofette inseminate. Sono stati registrati anche il numero di suinetti nati totali e nati vivi.

Analisi statistica

Gli effetti del trattamento sulla percentuale di scrofette che sono ritornate in estro e sulla numero di scrofe che hanno partorito (tasso di gravidanza) sono stati analizzati utilizzando il test di Fisher. Gli effetti del trattamento sulla consistenza della nidata sono stati analizzati ricorrendo al test di Wilcoxon-Mann-Whitney. Gli effetti sulla durata dell'intervallo tra la fine del trattamento e la comparsa dell'estro sono stati valutati utilizzando il test di Student.

RISULTATI

L'età ed il peso medio delle scrofette al momento dell'inseminazione è stato rispettivamente di 232 ± 3.8 giorni e di 138 ± 8.6 kg.

I dati sulla fertilità e prolificità dei vari trattamenti sono riassunti in tabella 1. La percentuale di scrofette andate in estro dopo il trattamento è stata del 95%, l'intervallo medio tra l'ultima somministrazione di AL e l'estro è stata di 5.5 ± 0.8 giorni, il punteggio medio attribuito all'intensità della manifestazione estrale è stato di 4.3 ± 0.6 e la percentuale di scrofe inseminate che hanno partorito è stata dell'84%. Per tutti questi parametri non ci sono state differenze tra i gruppi. Anche il numero di suinetti nati totali e nati vivi non è differito tra i gruppi.

Tabella 1: Prestazioni riproduttive di scrofette trattate con 20 mg/giorno di Alliltrenbolone (AL) per 18, 14, 12, o 10 giorni*. Alle scrofette trattate per 10 o 12 giorni sono stati somministrate delle PGF2alfa (cloprostenolo) alla fine del trattamento con Alliltrenbolone. Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi per tutti i parametri riproduttivi considerati. † L'intensità dell'estro è stata determinata secondo un punteggio dove 1=manifestazioni minime, 5=manifestazioni massime.

Table 1: Performance of reproductive gilts treated with 20 mg / day of Alliltrenbolone (AL) for 18, 14, 12, or 10 days*. Gilts treated for 10 or 12 days were administered with PGF2alpha (cloprostenol) at the end of Alliltrenbolone treatment. No significant differences were observed for all three groups about reproductive parameters considered. † The intensity of oestrus was determined according to a score where 1 = minimal manifestations and 5 = highest manifestations.

	AL18	AL14	AL12	AL10
Scrofette	196	135	97	73
Scrofette in estro(%)	188 (96)	129 (95)	91 (93)	69 (94)
Punteggio estro†	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.7
Intervallo AL-estro (gg)‡	5.2 ± 0.7	5.4 ± 1.5	5.6 ± 2.2	5.9 ± 2.7
Durata estro (ore)‡	54 ± 6.2	48 ± 8.1	56 ± 12.2	54 ± 11.4
Tasso di parto (%)	156 (82)	104 (80)	77 (84)	60 (82)
N suinetti totali nati ‡	13.3 ± 3.4	13.4 ± 2.5	12.8 ± 2.8	13.3 ± 2.5
N suinetti nati vivi ‡	12.2 ± 4.2	11.5 ± 4.2	10.8 ± 3.8	12.2 ± 4.3

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio, dal 93 al 96% delle scrofette è andata in estro entro 7 giorni dalla fine della somministrazione di alliltrembolone. Tali risultati sono sovrapponibili a quelli riportati in precedenti studi (Martinat-Butte et al., 1995; Stevenson et al., 1982), nei quali la somministrazione di AL per 14 o 18 giorni è stata in grado di sincronizzare l'estro tra i 5-7 giorni nell'84-96% delle scrofette trattate. L'ipotesi del nostro lavoro che la durata del trattamento con progesterone potesse modificare la fertilità delle scrofette trattate non ha trovato riscontro nei risultati. Infatti, la sincronizzazione dell'estro, il tasso di gravidanza e il numero di nati non è stato differente dopo la somministrazione di AL effettuata per un periodo più breve (10 o 12 giorni) rispetto a quello standard (14 o 18 giorni).

Nella specie bovina e ovina, ma presumibilmente anche nella cavalla, un trattamento prolungato con progesterone altera la secrezione di LH, lo sviluppo follicolare, la qualità degli oociti, l'ambiente uterino (Sirois and Fortune, 1990; Stock and Fortune, 1993; Kinder et al., 1996; Flynn et al., 2000; Garcia-Ispuerto et al., 2013). I dati del nostro studio indicano nella specie suina la somministrazione di un progestinico per tempi superiori ai 9 giorni non ha effetti negativi sulla fertilità. Infatti, Queste differenze tra la specie suina e le altre specie di animali domestici potrebbe essere correlata ai differenti meccanismi neuroendocrini di controllo dello sviluppo follicolare, delle ondate follicolari e alla determinazione della dominanza follicolare.

In conclusione, i dati di questo studio indicano che nella scrofetta la sincronizzazione degli estri, la fertilità e la prolificità dopo il trattamento con Alliltrembolone non si modifica a seguito di un trattamento per 10 o 12gg rispetto alla somministrazione standard di 14 o 18 giorni e che un trattamento prolungato con progesterone non interferisce sui meccanismi che controllano lo sviluppo follicolare.

BIBLIOGRAFIA

- Estienne M.J., Harper A.F. (2002) "Case study: Synchronization of estrus and fertility in gilts administered P.G. 600 after treatment with Regumate for 14 or 18 days". *The Prof Anim Scientist* 18, 158-161.
- Flynn J.D., Duffy P., Boland M.P., Evans A.C.O. (2000) "Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs" *AnimReprod Sci.* 62, 285-296.
- Garcia-Ispuerto I., Roselló M.A., De Rensis F., López-Gatius F. (2013) "A five-day progesterone plus eCG-based fixed-time AI protocol improves fertility over spontaneous estrus in high-producing dairy cows under heat stress" *J Reprod Dev.* 59, 544-548.
- Kinder J.E., Kojima F.N., Bergfeld E.G., Wehrman M.E., Fike K.E. (1996) "Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle" *J Anim Sci.* 74, 1424-1440.
- Kirkwood R.N. (1999) "Pharmacological intervention in swine reproduction". *Swine Health Prod.* 7, 29-35.
- Kirkwood R.N., Thacker P.A., Aherne F.X., Goonewardene L.A. (1996) "The effect of dose and route of administration of prostaglandin F2alfa on the parturiente response of sows". *Swine Health and Production* 4(3), 123-126.
- Knauer M.T., Cassady J.P., Newcom D.W., See M.T. (2010) "Estimates of variance components for genetic correlations among swine estrus traits". *J Anim Sci.* 88, 2913-2919.
- Kraeling R.R., Dziuk P.J., Pursel V.G., Rampacek B., Webel S.K. (1981) "Synchronization of estrus in swine with allyl trenbolone (RU-2267)". *J Anim Sci.* 52, 831-835.
- Lofstedt R.M., Patel J.H. (1989) "Evaluation of the ability of altrenogest to control the equine estrous cycle". *J Am Vet Assoc.* 194, 361-364.

- Martinat-Botte F., Bariteau F., Forgerit Y., Macar C., Poirier P., Terqui M. (1995) "Synchronization of oestrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival". *AnimReprod Sci.* 39, 267-274.
- Re G., Badino P., Novelli A., Vallisneri A., Girardi C. (1994) "Specific binding of DLcloprostenol and D-cloprostenol toPGF2 α receptors in bovine corpusluteum and myometrial membranes". *JVet PharmacolTher.* 17, 455-458.
- Rhodes M.T., Davis D.L., Stevenson J.S. (1991) "Flushing and altrenogest affect litter traits in gilts". *J Anim Sci.* 69, 34-40.
- Sirois J., Fortune J.E. (1990) "Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone a model for studying ovarian follicular dominance" *Endocrinology* 127, 916-925.
- Stevenson J.S., Davis D.L. (1982) "Estrous synchronization and fertility in gilts after 14- or 18-day feeding of altrenogest beginning at estrus or diestrus". *J Anim Sci.* 55, 119-123.
- Stock A.E., Fortune J.E. (1993) "Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters" *Endocrinology* 132, 1108-1114.

ANALGESIA DEL SUINETTO ALLA CASTRAZIONE: EFFETTO DEL DICLOFENAC SU PARAMETRI COMPORTAMENTALI E FISIOLOGICI

ANALGESIA IN PIGLETS SUBMITTED TO CASTRATION: DICLOFENAC EFFECTS ON BEHAVIOURAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

SCOLLO, A.^{1,2}, CONTIERO, B.¹, TAVELLA, G.², RAFFI, V.², AMORICO, A.²,
GOTTARDO, F.¹, MAZZONI, C.²

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

² SUIVET Corresponding author: scollo@suiwet.it

Parole chiave: castrazione, analgesia, suinetto, diclofenac.

Key words: castration, analgesia, piglet, diclofenac.

Riassunto

L'analgesia del suinetto durante la castrazione chirurgica è oggetto di crescente pressione dell'opinione pubblica. Scopo dello studio è stato valutare l'effetto del diclofenac nella riduzione del dolore da castrazione, utilizzando parametri comportamentali e fisiologici. Sono rientrati nella prova 132 suinetti maschi divisi in tre gruppi: solo manipolati (M), castrati senza analgesia (C), e preventivamente trattati con diclofenac (D). Le osservazioni comportamentali sono state effettuate quattro volte di 30 minuti ciascuna (00h00, 00h30, 03h30 e 24h00 post-castrazione). Per la determinazione del cortisolo sierico sono stati effettuati due prelievi di sangue (00h30 e 02h00 post-castrazione). I comportamenti di poppata (sincronizzata o isolata) e di decubito sternale sono stati espressi in frequenza significativamente diversa tra i gruppi M e C. La frequenza del gruppo D si è collocata a livello intermedio per i comportamenti poppata sincronizzata e decubito sternale. Per il comportamento poppata isolata, le frequenze dei gruppi M e D erano statisticamente diverse da quella del gruppo C ($P < 0,05$). La media delle concentrazioni sieriche di cortisolo si è dimostrata significativamente inferiore nei gruppi M e D rispetto a quella del gruppo C ($P < 0,05$). I risultati suggeriscono che la somministrazione preventiva di diclofenac possa ridurre le alterazioni comportamentali e fisiologiche conseguenti alla castrazione, migliorandone gli aspetti di benessere animale.

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 diclofenac administered before castration to alleviate the pain. The study involved 132 male piglets, divided into tre groups: handled only (M), castrated without analgesia (C), and treated with diclofenac before castration (D). Behaviour was observed for 130 minutes at four time points from castration (0h00, 0h30, 3h30, 24h00). Blood samples were collected 0h30 and 2h00 after castration for cortisol concentration. Suckling behaviours (synchronized or isolated) and sternal recumbency were significantly influenced by castration, showing differences between groups M and C ($P < 0,05$). D group showed intermediate levels in relation to time spent in sternal recumbency and

synchronized suckling, without significant differences with group M. Isolated suckling and mean serum cortisol level were lower in groups M and D in comparison with group C ($P < 0,05$). Results suggest that administration of diclofenac before castration reduces behavioral and physiological changes, contributing to relieving pain and improving animal welfare.

INTRODUZIONE

La castrazione chirurgica dei suinetti, che coinvolge annualmente 96 milioni di suini maschi in Europa, è la pratica manageriale maggiormente adottata per eliminare l'odore di verro nella carne suina. La castrazione chirurgica è per lo più effettuata senza alcun uso di antidolorifici, ed è per questo considerata una pratica altamente stressante per il suinetto a prescindere dalla sua età (Carroll et al., 2006; Taylor et al., 2001). Per questo motivo, l'argomento sta sollevando pesanti critiche da parte dell'opinione pubblica in quanto non concernente i principi base del benessere animale che sottolineano la necessità di evitare loro della sofferenza (Sutherland et al., 2012). A seguito delle spinte provenienti dal consumatore, la Dichiarazione Europea sulle alternative alla castrazione chirurgica del suino invita al completo abbandono della pratica entro il 2018. Ad ogni modo, la Dichiarazione riconosce la necessità della castrazione in alcune realtà produttive tradizionali, con lo scopo di mantenere elevate le caratteristiche di qualità del prodotto. Per queste ragioni, vengono richieste metodologie di castrazione che utilizzino analgesia e/o anestesia nel caso di prodotto DOP e IGP. Il suino pesante rientra dunque tra le realtà produttive per le quali l'abolizione della castrazione non verrà richiesta, allevando animali che raggiungono i 160 kg di peso e l'età di 9 mesi, quando la maturità sessuale è raggiunta e potenzialmente responsabile dello sgradito odore di verro. Tuttavia, nemmeno per il suino pesante sembra sostenibile ancora a lungo la castrazione senza utilizzo di analgesia e/o anestesia.

Scopo del presente lavoro è stato verificare l'efficacia del Diclofenac nell'alleviare il dolore post-castrazione nei suinetti. Indicatori comportamentali e fisiologici sono stati utilizzati per la valutazione del dolore.

MATERIALI E METODI

Animali

La prova ha coinvolto un totale di 132 suinetti (ibridi commerciali) nati da 44 scrofe. Per l'identificazione individuale degli animali, mezz'ora prima della castrazione ed in concomitanza con la somministrazione ai suinetti dei diversi trattamenti, ciascun animale è stato numerato in ordine progressivo sul dorso con un apposito pennarello. Sono stati selezionati suinetti di età compresa tra i 4 ed i 5 giorni e di peso medio intorno ai 2 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.

Comportamento o posizione	Descrizione
Cammina	Il suinetto si sposta camminando
Stazione	Il suinetto resta fermo in piedi
Decubito laterale	Il suinetto si trova disteso in decubito laterale
Decubito sternale	Il suinetto si trova disteso in decubito sternale
Poppata sincronizzata	Il suinetto si alimenta al capezzolo della madre insieme agli altri fratelli
Poppata isolata	Il suinetto si alimenta al capezzolo della madre (o tenta di farlo) da solo
Seduto	Il suinetto resta fermo seduto
Localizzazione o atteggiamento	
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, cifosi, agitazione della coda, grattamento della regione perianale.

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

Table 1. Behaviours recorded during the observation and their description.

Trattamenti

I suinetti sono stati suddivisi in 3 gruppi di trattamento, ciascuno rappresentato da 44 soggetti equamente distribuiti tra le 44 scrofe, tale per cui ciascuna nidiata aveva all'interno un 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;
- D: Diclofenac. Sono stati somministrati per via intramuscolare con ago da insulina 2,3 mg di diclofenac sodico/kg (Reuflogin ®) a ciascun soggetto mezz'ora prima della castrazione, pari a 0,05 ml di prodotto/kg;

Il contenimento dei suinetti, la castrazione e la somministrazione di farmaco pre-intervento sono stati effettuati sempre dallo stesso operatore.

Rilevazioni

Per evitare qualsiasi influenza dovuta alle diverse manualità necessarie per ciascuna tipologia di dati raccolti, la totalità dei suinetti è stata suddivisa in 2 gruppi, di cui uno destinato alle osservazioni comportamentali ed uno utilizzato per i prelievi di sangue.

Il primo gruppo, composto da 72 suinetti ($n = 24$ per ciascun trattamento), è stato sottoposto a 4 osservazioni comportamentali dirette post-intervento, ciascuna della durata di 30 minuti e con inizio dopo 0h00, 1h00, 3h30, 24h00 dalla castrazione. Le osservazioni sono state effettuate con il metodo scan sampling (scan = 1 minuto ogni 2 minuti) da 2 operatori preventivamente formati, che hanno registrato in quale dei comportamenti indicati in Tabella 1 era impegnato ciascun suinetto.

Nel secondo gruppo di prova, composto da 60 suinetti ($n = 20$ per ciascun trattamento), sono stati invece effettuati 2 prelievi di sangue individuali a 0h30 e 2h00. 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 processati statisticamente tramite test ANOVA repeated con una PROC MIXED (SAS 9.2) valutando gli effetti dei tre trattamenti, dei 4 diversi intervalli di osservazione e delle loro interazioni. Le medie sono state comparate utilizzando il test di Bonferroni. Per una maggiore completezza di analisi, i dati comportamentali sono stati analizzati anche tramite una proc GLM per il confronto tra medie. Inoltre, le frequenze dei diversi comportamenti sono state analizzate tramite analisi GENMOD.

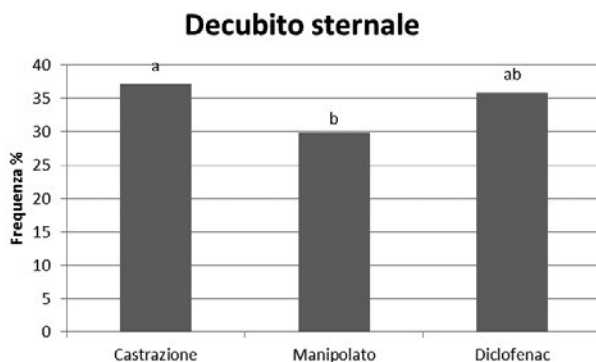


Figura 1. Frequenza media percentuale di decubito sternale nei tre gruppi di trattamento (analisi GLM).

Figure 1. Average frequency (%) of sternal lying in the three treatment groups (GLM analysis).

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

^{a,b} Different letters indicate significant statistical differences ($P < 0,05$).

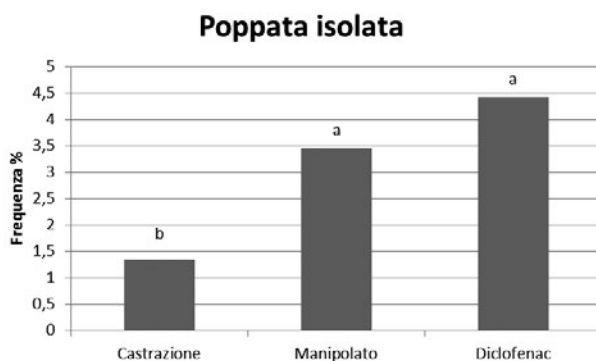


Figura 2. Frequenza media percentuale di poppate isolate nei tre gruppi di trattamento (analisi GENMOD).

Figure 2. Average frequency (%) of isolated suckling in the three treatment groups (GENMOD analysis).

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

^{a,b} Different letters indicate significant statistical differences ($P < 0,05$).

RISULTATI

I comportamenti che si sono dimostrati essere maggiormente variabili tra i gruppi di trattamento sono stati decubito sternale con l'analisi GLM, e poppata sincronizzata e poppata isolata con l'analisi delle frequenze GENMOD.

Il gruppo dei castrati convenzionali ha impiegato maggiore tempo in decubito sternale rispetto al gruppo dei manipolati ($P = 0,05$), mentre il gruppo trattato con diclofenac ha manifestato attività intermedia, senza alcuna differenza statistica con i manipolati (Fig.1).

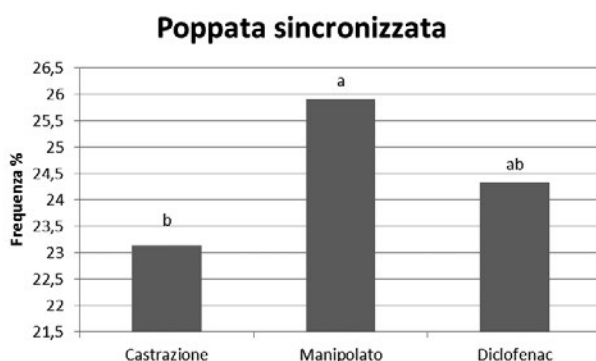


Figura 3. Valori medi di cortisolo sierico ($\mu\text{g/dl}$) per ciascun trattamento.

Figure 3. Average levels of sieric cortisol ($\mu\text{g/dl}$) for each treatment.

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

^{a,b} Different letters indicate significant statistical differences ($P < 0,05$).

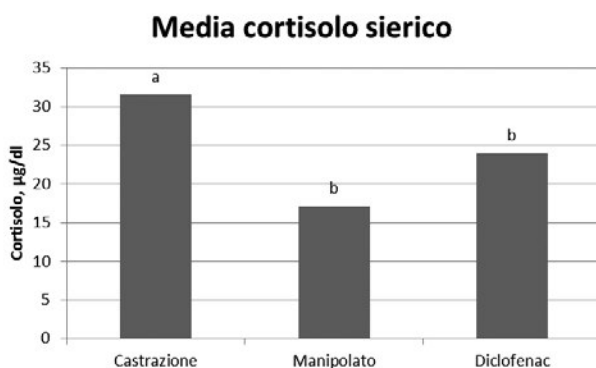


Figura 4. Frequenza media percentuale di poppate sincronizzate nei tre gruppi di trattamento (analisi GENMOD).

Figure 4. Average frequency (%) of synchronized suckling in the three treatment groups (GENMOD analysis).

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

^{a,b} Different letters indicate significant statistical differences ($P < 0,05$).

Per quanto riguarda invece la poppata isolata (Fig.2), i gruppi dei manipolati e dei suinetti trattati con diclofenac hanno mostrato frequenze statisticamente uguali tra loro, e nettamente maggiori rispetto a quelle osservate per il gruppo dei castrati convenzionali (gruppo manipolati: $P < 0,001$; gruppo diclofenac: $P = 0,004$). Una distribuzione inversa delle frequenze si è osservata invece per le poppate sincronizzate (Fig.3), con valori del gruppo diclofenac intermedi tra quelli dei gruppi dei castrati convenzionali e dei manipolati (gruppo castrazione vs. gruppo manipolati: $P = 0,0187$).

Per tutti gli altri comportamenti non si sono invece registrate significatività statistiche. Dall'analisi del cortisolo sierico emerge che a 0h30 dalla castrazione i manipolati avevano livelli nettamente inferiori rispetto ai castrati (18,5 vs. 40,8 $\mu\text{g/dl}$; $P < 0,001$); tale differenza non era più riscontrabile a 2h00. Sebbene a 0h30 il cortisolo del gruppo diclofenac fosse statisticamente simile al gruppo dei castrati (34,8 $\mu\text{g/dl}$; $P > 0,05$), considerando la media dei due prelievi il valore del cortisolo medio del gruppo trattato con diclofenac risulta statisticamente equivalente a quello del gruppo dei manipolati (Fig.4).

DISCUSSIONE

I risultati emersi dal presente lavoro sottolineano come l'intervento di castrazione provochi sui suinetti alterazioni comportamentali e fisiologiche associabili ad un dolore di tipo acuto, così come già evidenziato da numerosi autori (McGlone et al., 1993; Taylor et al., 2001; Hay et al., 2003; Fredriksen et al., 2011). In particolare, la manifestazione di alcune attività non specifiche e normalmente espresse dal suinetto, quali la poppata ed il decubito, è risultata significativamente differente tra il gruppo dei suinetti castrati senza analgesia (C) e quello dei manipolati (M).

I suinetti castrati senza analgesia (C) hanno manifestato una maggiore frequenza di decubito sternale rispetto al gruppo dei manipolati (M), suggerendo che tale postura possa essere un valido indicatore di dolore post-castrazione. In una recente review sull'identificazione degli atteggiamenti di dolore negli animali da reddito, Prunier et al. (2013) elencano tra le posture ed i comportamenti correlati al dolore anche il decubito sternale. Nel suino, la perseveranza di posizione è stata precedentemente osservata da Hay et al. (2003) e Llamas Moya et al. (2008) dopo la castrazione, ma simili risultati sono emersi anche nell'agnello (Molony et al., 1993, 2002). L'ipotesi più plausibile è che tale posizione riduca la percezione dello stimolo dolorifico diminuendo la tensione fisica sui tessuti interessati dalla castrazione. Le frequenze percentuali relative ai comportamenti di poppata, sia sincronizzata che isolata, rilevano come i suinetti castrati (C) trascorrono meno tempo alla mammella rispetto ai manipolati (M), in accordo con quanto evidenziato da Hay et al. (2003) nelle prime ore dopo la castrazione. Anche Mellor et al., (2000) e Llamas Moya et al. (2008) individuano l'attività di poppata tra i comportamenti di tipo attivo che il suinetto svolge con frequenza minore dopo la castrazione, con lo scopo di limitare l'ulteriore sollecitazione dei tessuti che deriverebbe dal movimento o dal contatto ravvicinato con i fratelli.

Secondo diversi autori (Wood et al., 1991; Molony et al., 1997) il cortisolo sierico rappresenta un efficace indicatore della presenza e dell'intensità dello stress acuto negli animali, specie se associato ad una valutazione comportamentale (Leslie et al., 2010). La significatività della rilevazione della cortisolemia entro i 60 minuti dall'evento stressante è riportata in numerosi lavori (Prunier et al., 2005; Carroll et al., 2006; Marchant-Forde et al., 2009; Sutherland et al., 2012), in cui si afferma come oltre questo periodo i livelli di cortisolo inizino a normalizzarsi e non forniscano più indicazioni rappresentative. A supporto delle precedenti affermazioni, in questa prova la concentrazione di cortisolo nel siero è risultata maggiore nei suinetti castrati senza trattamento (C) rispetto al gruppo dei manipolati (M), con un'importante differenza tra la rilevazione a 00h30 e quella a 02h00.

Il trattamento preventivo con diclofenac ha influenzato la risposta dei suinetti alla castrazione sia per il comportamento di decubito che per quelli di suzione, mostrando livelli di frequenza intermedi tra i manipolati ed i castrati con metodo convenzionale. Sebbene non abbia fatto emergere invece alcun miglioramento dei parametri ematici a 00h30, la media dei livelli di cortisolo tra i due prelievi (00h30 e 04h00) è risultata essere pari a quella dei manipolati. Tale risultato suggerisce un possibile coinvolgimento della farmacocinetica del diclofenac e delle tempistiche di assorbimento. La concentrazione del farmaco del sangue potrebbe non essere stata massima al momento della castrazione e nella successiva mezz'ora, per poi aver raggiunto i livelli sufficienti a determinare un evidente calo del cortisolo sierico. Ulteriori studi sul più idoneo momento di somministrazione del diclofenac pre-castrazione potrebbero confermare l'ipotesi.

In conclusione, il presente studio conferma la comparsa di alterazioni di tipo comportamentale e fisiologico legate alla procedura di castrazione, riferibili ad uno stato di stress e dolore acuto. Il trattamento analgesico preventivo dei suinetti con diclofenac sembra ridurre tali alterazioni, suggerendo una diminuzione dello stress indotto dalla castrazione ed il miglioramento degli standard di benessere animale concernenti tale pratica.

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.
- 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.
- Leslie E., Hernández-Jover M., Newman R., Holyoake P. (2010). Assessment of acute pain experienced by piglets from ear tagging, ear notching and intraperitoneal injectable transponders. *Applied Animal Behaviour Science* 127; p.86–95.
- Llamas 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.
- Marchant-Forde J.N., Lay D.C., McMunn K.A., Cheng H.W., Pajor E.A., Marchant-Forde R.M. 2009. Postnatal piglet husbandry practices and well-being: The effects of alternative techniques delivered separately. *J. Anim. Sci*; 87:1479-1492.
- 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 behavioral changes. *Journal of Animal Science* 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.
- Molony V., Kent J.E., Robertson I.S. 1993. Behavioral responses of lambs of three ages in the first three hours after three methods of castration and tail docking. *Research in Veterinary Science* 55:2, 236-245.
- Molony V., Kent J.E. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci* 75:266–272.
- Molony V., Kent J.E., McKendrik I.J. 2002. Validation of a method of assessment of an acute pain in lambs. *Applied Animal Behaviour Science* 76:3, 215-238.
- Prunier A., Mounier A., Hay M. 2005. Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *J. Anim. Sci*; 83:216–222.

- Prunier A., Mounier L., Le Neindre P., Leterrier C., Mormède P., Paulmier V., ... & Guatteo R. 2013. Identifying and monitoring pain in farm animals: a review. *Animal: an international journal of animal bioscience* 7:6, 998-1010.
- Sutherland M.A., Davis B.L., Brooks T.A., Coetzee J.F. 2012. The physiological and behavioral response of pigs castrated with and without anesthesia or analgesia. *J. Anim. Sci*; 90: 2211-2221.
- 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.
- Wood G.N., Molony V., Fleetwod-Walker S.M., Hogdson J.C., Mellor D.J. 1991. Effects of local anaesthesia and intravenous naloxone on the changes in behaviour and plasma concentrations of cortisol produced by castration and tail docking with tight rubber rings in young lambs. *Research in veterinary science* 51:2, 193- 199.

IL BENESSERE ANIMALE DEL SUINO GRASSO ITALIANO IN ALLEVAMENTO: VALUTAZIONE AL MACELLO

THE ANIMAL WELFARE OF FATTENING ITALIAN PIG IN BREEDING: ASSESSMENT AT SLAUGHTERHOUSE

MAISANO A. M.*, LUINI M.*, ATTANASIO G.***, VEZZOLI F.*.

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi*

****A.S.L. della Provincia di Cremona*

Parole chiave: benessere animale, animal-based measures, suino, allevamento, macello

Key words: animal welfare, animal-based measures, pigs, farm, slaughter

Riassunto

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare sulla possibilità di valutare al macello il Benessere Animale (BA) in allevamento nella specie suina. Vengono esposti i dati osservati su 10.085 suini grassi al macello, provenienti da 54 allevamenti della pianura padana. Le osservazioni sono state registrate durante le visite ante-mortem e post-mortem, secondo i principi delle Animal Based Measures (ABM). La valutazione di 28 osservazioni per ciascuna partita (62) di macellazione, raggruppate in 5 principi, ha generato un punteggio generale, come descritto dal protocollo Welfare Quality® (WQ). I relativi calcoli sono stati sviluppati seguendo gli algoritmi del WQ, riadattati in base, al modello di allevamento intensivo nazionale, ed alle caratteristiche del suino pesante italiano. In 15 allevamenti di provenienza è stato valutato anche il BA in azienda e i relativi punteggi sono stati calcolati in modo analogo a quelli del macello ma tenendo conto sia delle ABM sia delle misure indirette. Le prevalenze medie delle ABM rilevate al macello, mettono in evidenza principalmente le problematiche riconducibili all'inadeguatezza delle strutture (Imbrattamento fecale 1 e 2 47,7% e Bursiti 1 e 2 23,7%) ed alla elevata prevalenza di segni riferibili a parassitosi (White spot 25,4% e Dermatiti ad eziologia varia 28%). Infine dal confronto dei punteggi di BA ottenuti al macello e nei rispettivi allevamenti di provenienza, l'analisi, conferma che gli tutti gli score, tranne quello riguardante le lesioni, risultano correlati in maniera statisticamente significativa; suggerendo la possibilità di valutare il BA in allevamento attraverso osservazioni al macello, mantenendo un costante monitoraggio con specifici indicatori.

Abstract

The aim of this work was to investigate on the possibility of assessing the Animal Welfare (AW) in swine farming at slaughterhouse. Here, are presented the observed data on 10.085 fattening pigs at slaughterhouse, coming from 54 farms in pianura padana. This data were collected during ante-mortem and post-mortem, according to the principles of Animal Based Measures (ABM). The assessment of 28 observations for each batch (62) of slaughter, grouped into five principles, has generated an overall score, as described by the Welfare Quality® protocol (WQ). The results have been developed following the algorithms of WQ and they were adapted according to the model of intensive national farming, and the characteristics of Italian fattening pigs. It was also studied in 15 farms of origin the AW in farmhouse and their scores were calculated in a similar way to the slaughterhouse result but taking into account the ABM and structural measures. The measured mean value of ABM recorded at slaughter, highlights problems mainly due to the structure's inadequacy (Manure on the body 1 and 2 47.7% and bursitis 1 and 2 23.7%) and to the high prevalence of signs related to parasites (White spot 25.4% and Dermatitis etiology varies

28%). Excepted those carried out on lesion, the AW compared scores obtained at slaughter and farms are correlated in a statistically significant way. It suggests the possibility of evaluating the AW of breeding through observations at the slaughterhouse, maintaining a constant monitoring through specific indicators.

INTRODUZIONE

Il Benessere Animale (BA) nella società europea moderna è una tematica sempre più attuale, e anche a livello zootecnico ormai la filiera esige degli standard minimi; la definizione di BA è l'insieme delle seguenti definizioni: "Il benessere è uno stato di salute completo, sia fisica che mentale, in cui l'animale è in armonia con il suo ambiente", (Huges, 1976); "Il benessere di un organismo è il suo stato in relazione ai suoi tentativi di adattarsi all'ambiente" (Broom 1986); le 5 libertà (Brambell Report nel 1965) a garanzia del BA: libertà dalla fame, dalla sete e dalla cattiva nutrizione; libertà dai disagi ambientali (possibilità di disporre di un ambiente fisico adeguato e confortevole); libertà dalle malattie e dalle ferite; libertà di manifestare le caratteristiche comportamentali specie-specifiche; libertà dalla paura e dallo stress (FAWC 2009, OIE 2011).

In Italia per la specie suina, vige una normativa sul BA, derivata dal recepimento delle Direttive Comunitarie e attuate con il D.Lgs.146 del 26 marzo 2001 e il D.Lgs.122 del 7 luglio 2011. Le leggi prendono in considerazione solamente i parametri ambientali, e non le cosiddette Animal Based Measures (ABM), ovvero le osservazioni dirette sull'animale, mentre altri protocolli di valutazione più recenti come quello messo a punto dal progetto Welfare Quality® (WQ), considerano sia la componente strutturale sia la componente ABM. Nel protocollo WQ le rilevazioni si basano su 12 criteri (assenza prolungata da fame, da sete, comfort del riposo, comfort termico, facilità di movimento, assenza di lesioni, assenza di malattie, assenza di dolore indotto da pratiche gestionali, espressione di un comportamento sociale, di altri comportamenti, di buona relazione con l'uomo e uno stato emozionale positivo) riconducibili ai quattro principi di riferimento: il comportamento (Appropriate behaviour), l'alimentazione (Good feeding), l'appropriatezza dei ricoveri (Good housing) e la salute degli animali (Good health) (WQ, 2009). L'EFSA (European Food Safety Authority) si è pronunciata a favore della valutazione congiunta che comprende sia l'analisi delle strutture che delle ABM (EFSA 2012 a,b; 2014); queste ultime possono essere utilizzate efficacemente poiché forniscono informazioni sui principali rischi in allevamento, ribaditi in precedenti pareri scientifici, riguardanti il BA (EFSA, 2005, 2006, 2007a, b, c).

Il macello può risultare un punto strategico di controllo in quanto passaggio obbligato alla fine del ciclo produttivo e sede delle normali pratiche di ispezione sanitaria. Inoltre è necessario ricordare che la normativa comunitaria, prevede che l'ispezione ante-mortem presso il macello contempli "un esame diagnostico per accertare se siano state rispettate le norme relative al benessere degli animali e se vi siano segni di condizioni che potrebbero influire negativamente sulla salute umana o degli animali" (Reg.CE 854/2004).

Questo lavoro, svolto nell'ambito di un progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute, ha avuto come obiettivo la messa a punto di un sistema di valutazione del BA in allevamento mediante le rilevazioni al macello eseguibili ante-mortem e post-mortem, orientate alla logica delle ABM.

MATERIALI E METODI

Scelta degli animali e degli allevamenti

Le osservazioni sono state condotte su 10.085 suini grassi provenienti da 54 allevamenti localizzati in pianura padana, durante il periodo marzo – ottobre 2014.

I rilievi hanno interessato 62 partite di macellazione e sono stati eseguiti allo scarico in fase di visita ante-mortem (10.085) e al punto di ispezione veterinario in fase di visita post-mortem (7.952). Ogni singola partita è stata indagata nel 50% dei capi sui visceri e nel 50% sulla carcassa.

Successivamente sono stati scelti 15 allevamenti classificati in diverse categorie di valutazione, secondo i punteggi ottenuti dalle nostre osservazioni al macello.

Schede di registrazione ed elaborazione del punteggio

Sono state scelte le ABM rilevabili al macello e da noi considerate le più indicative del BA dell'allevamento di provenienza (tab.1). Si tratta di 28 rilievi raggruppati in 5 principi di Appropriate behaviour (n.2), Good feeding (n.2), Good housing (n.4), Good health-lesioni (n.6) e Good health-sanità (n.14).

La valutazione al macello, di ogni partita, è stata elaborata in un punteggio numerico (0-100) per ogni principio (escluso l'Appropriate behaviour) e in uno score finale; quest'ultimo è stato espresso in forma numerica (0-100), stabilito dalla media algebrica dei punteggi di 4 principi (escluso l'Appropriate behaviour), e categorica (Not classified (Non classificato), Accettable (Accettabile), Enhanced (Buono) e Excellent (Eccellente)), secondo delle soglie stabilite sulla base di valutazioni personali e dopo consultazione di esperti.

I dati raccolti sono stati elaborati tramite il foglio di calcolo Excel® per Windows®, al fine dell'ottenimento dei risultati sopracitati. I calcoli sono stati basati sugli algoritmi presentati del WQ (WQ, 2009), e riadattati per necessità (impossibilità di effettuare singoli rilievi) e rilevanza in base, al modello di allevamento intensivo nazionale, ed alle caratteristiche intrinseche, del suino pesante italiano.

In allevamento sono state effettuate le rilevazioni utilizzando la check-list proposta dal Centro di Riferenza Nazionale sul Benessere Animale (CReNBA); che comprende una parte generale, 5 gruppi di osservazioni strutturali (Superficie disponibile-Pavimentazione, Locali di stabulazione, Alimento-Acqua e Materiali manipolabili) e 7 gruppi di rilevazioni ABM (Igiene del corpo, Lesioni da aggressioni, Ferite, Condizione clinica, Stereotipie, Comportamenti aggressivi e Interazioni positive tra animali) raggruppabili secondo i 4 principi WQ di Good feeding, Good housing, Good health e Appropriate behaviour. Per poter comparare i punteggi è stato scomposto il risultato del principio Good health in Good health-sanità e Good health-lesioni.

I calcoli per la valutazione del BA in allevamento sono stati sviluppati dal nostro gruppo di ricerca ed elaborati in un punteggio finale numerico (0-100), stabilito dalla media algebrica dei punteggi dei 4 principi e categorico (Not classified, Accettable, Enhanced e Excellent) secondo l'algoritmo decisionale proposto dal WQ (WQ, 2009).

I punteggi ottenuti al macello e in allevamento divisi per principi, sono stati analizzati e la correlazione è stata valutata attraverso l'analisi della regressione lineare con il componente aggiuntivo dell'analisi della varianza sui residui, con i limiti di confidenza al 95%.

RISULTATI

In tab.2 sono riportate le prevalenze medie delle rilevazioni eseguite su tutta la popolazione presa in esame; rilevamenti su 10.085 capi ante-mortem e 7.952 capi post-mortem.

In tab.3 sono riportati i punteggi al macello dei quindici allevamenti selezionati e nella tab.4 i relativi punteggi in allevamento.

Nella tab. 5 sono riportati i risultati di correlazione dei punteggi rilevati al macello e in allevamento.

DISCUSSIONE

I principi del BA valutabili al macello, secondo le categorie proposte dal WQ (WQ, 2009), sono quelli di Good feeding, Good housing e Good health (Good health-lesioni e Good health-sanità); per quanto riguarda l'Appropriate behaviour, le osservazioni individuate (riluttante al movimento e torna indietro, WQ, 2009) non influivano in modo significativo (prevalenza media 0,42% e 0,41%) e risultavano fortemente condizionate da variabili esterne (trasportatore, lunghezza del viaggio, procedure di scarico, personale, osservatore, ecc...), che quindi non ne permettevano un'obiettiva interpretazione. Di conseguenza questo principio è stato escluso dalla valutazione al macello da noi eseguita.

Relativamente al Good housing, i dati rilevati evidenziano problematiche strutturali verosimilmente legate alla tipologia di allevamento del suino grasso italiano ovvero: l'igiene della superficie corporea (28% dei soggetti con imbrattamento fecale di grado 1 e il 19% di grado 2) e il comfort del riposo (bursiti 1 al 21%). Tali problematiche sono state evidenziate in merito alla tipologia della pavimentazione negli allevamenti intensivi suinicoli (EFSA 2005).

Relativamente al Good feeding, al macello, non è possibile ottenere l'informazione sulla disponibilità d'acqua, molto rilevante nella valutazione in allevamento ma non evidenziabili in questa sede. Le nostre osservazioni al macello evidenziano che i soggetti non uniformi in media si attestano al 2%, un dato decisamente rilevante se si considera che i capi sono di alta categoria merceologica. Inoltre per avere un quadro generale e un punteggio più significativo riguardante l'uniformità, le osservazioni sono state implementate attraverso la rilevazione del numero di lettere (identificativo del mese di nascita) diverse del prosciutto presenti nella partita.

Relativamente al Good health-lesioni, le osservazioni condotte mettono in evidenza una situazione poco preoccupante, con zoppie <0,7% e ferite del corpo <3% ed una prevalenza dei gradi lievi. Una situazione sfavorevole è stata evidenziata per le lesioni all'orecchio, >3%, che si possono considerare come un possibile indice di malessere riferibile all'allevamento d'origine (es. otoematoma, necrosi della punta, morsicatura) (EFSA 2012b, Smulders et al. 2006).

Good health-sanità, le osservazioni condotte a livello dell'apparato respiratorio riportano una prevalenza media di polmoniti al 17%, valore decisamente superiore ai livelli di allarme proposti dal WQ, 6%; mentre le pleuriti si attestano a circa il 26%, valore inferiore al limite di attenzione, 28% (WQ, 2009). Uno studio recentemente pubblicato ha riscontrato valori decisamente più preoccupanti, 46,4% di sola polmonite enzootica, e 47,5% di pleurite cronica (Merialdi G. et al. 2012); tuttavia è corretto sottolineare che nel nostro studio le osservazioni sono state condotte solo ed esclusivamente tramite ispezione visiva, senza palpazione o incisione dei visceri e va considerato che la stagionalità delle patologie può aver giocato un ruolo determinante.

L'osservazione delle white spot al 25% come dato medio rispecchia una problematica che non solo identifica un aspetto sanitario carente, ma anche la seria possibilità di perdite economiche nel caso di gravi infestazioni (Boes et al. 2010).

Un'osservazione interessante riguarda le dermatiti, riscontrate nel 28% degli animali, un dato di difficile interpretazione poiché legato a varie eziologie; tuttavia dovrebbe stimolare dei controlli più serrati e l'eventuale utilizzo di una terapia antiparassitaria quando necessaria (Galuppi et al. 2007).

I punteggi di Good housing e il Good health-sanità rilevati al macello hanno mostrato correlazione con i punteggi in allevamento (R rispettivamente di 0,74 e 0,67), dimostrandosi estremamente rilevanti e discriminatori. Lo score di Good feeding al macello è risultato

mediamente correlato con quello in allevamento ($R=0,55$) e rimane un dato puramente indicativo di gestione zootecnica. Il punteggio di Good health-lesioni al macello non ha rispecchiato le osservazioni condotte in allevamento e necessita una revisione più approfondita ($R=0,33$). Lo score Generale ha dimostrato un'alta correlazione ($R=0,63$) nonostante l'esclusione del principio Appropriate behaviour. L'analisi della regressione con il valore di R^2 corretto e l'analisi della varianza con la significatività F confermano quanto sopraesposto (Tab.5).

CONCLUSIONI

I risultati relativi alle prevalenze medie sottolineano due punti di dibattito molto interessanti, uno riguardo l'inadeguatezza delle strutture nel mantenere animali puliti e senza bursiti; e l'altro alla problematica delle parassitosi che ancora al 2014 si presentano in percentuali non accettabili, e di grande impatto sul BA.

In conclusione i risultati ottenuti con la presente ricerca dimostrano che le osservazioni al macello, essendo relativamente pratiche da effettuare, possono essere utilmente applicate alla valutazione del BA degli allevamenti di provenienza, ed essere ripetute per un monitoraggio continuo. Inoltre il riscontro di un punteggio sfavorevole in uno o più principi può identificare le principali problematiche in azienda e in casi estremi delineare la presenza di non conformità per le quali sono necessari interventi immediati. Tuttavia questo metodo di valutazione non può prescindere completamente dalla visita aziendale poiché le eventuali non conformità legislative devono essere confermate in campo. Questo naturalmente vale anche per la situazione di tutte le altre categorie di animali in accrescimento presenti in allevamento (es. svezzamento o in sala parto); che di fatto in misura assai limitata vengono monitorate con le osservazioni al macello.

Il metodo necessita, di una validazione ampliando le osservazioni macello-allevamento a molte più partite-allevamenti, e deve essere integrato stabilendo per ogni singola osservazione dei livelli di Attenzione (livello oltre la soglia di normalità), Allarme (livello problematico di richiamo e/o visita in allevamento) ed Emergenza (livello critico, d'azione immediata in allevamento).

I risultati preliminari sono fortemente indicativi del fatto che con la registrazione delle osservazioni in gran parte già svolte dai Veterinari Ispettori delle ASL (Ispezione ante-mortem e post-mortem) si possano acquisire elementi indicativi della situazione di benessere negli allevamenti di provenienza degli animali macellati. Sulla base di queste osservazioni e con criteri mirati e già basati sulle ABM sarebbe possibile selezionare gli allevamenti a rischio dove effettuare le ispezioni di BA.

BIBLIOGRAFIA

Boes J., A. Kanora, K.T. Havn, S. Christiansen, K. Vestergaard-Nielsen, Jos Jacobs, L. Alban. (2010) "Effect of *Ascaris suum* infection on performance of fattening pigs." *Veterinary Parasitology* 172 269–276

Broom DM, (1986) "Indicators of poor welfare" *The British Veterinary Journal*, 142, 524–526.

EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2014) "Scientific Opinion concerning a multifactorial approach on the use of animal and non-animal-based measures to assess the welfare of pigs." *EFSA Journal* 2014;12(5):3702, 101 pp. doi:10.2903/j.efsa.2014.3702

EFSA (European Food Safety Authority) (2012 a) “Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. Statement on the use of animal-based measures to assess the welfare of animals.” Parma, Italy EFSA Journal 2012;10(6):2767

EFSA (European Food Safety Authority) (2012 b) “Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on the use of animal-based measures to assess welfare in Pigs.” EFSA Journal 2012;10(1):2512

EFSA (European Food Safety Authority) (2007a) “Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on Animal health and welfare aspects of different housing and husbandry systems for adult breeding boars, pregnant, farrowing sows and unweaned piglets.” The EFSA Journal, 572, 1-13.

EFSA (European Food Safety Authority) (2007b) “Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on Animal health and welfare in fattening pigs in relation to housing and husbandry.” The EFSA Journal, 564, 1-14.

EFSA (European Food Safety Authority) (2007c) “Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on the risks associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need for tail docking considering the different housing and husbandry systems.” The EFSA Journal, 611, 1-13.

EFSA (European Food Safety Authority) (2005) “Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types.” The EFSA Journal, 268, 1-19.

FAWC (Farm Animal Welfare Council), (2009) “Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future” 57 pp. Available from [HTTP://WWW.FAWC.ORG.UK/REPORTS.HTM](http://www.fawc.org.uk/reports.htm)

Galuppi R., Avenoso A.M., Leotti, G., Ostanello, F., Poglayen, G. and Tampieri, M.P., (2007) “Diagnosis of sarcoptic Mange in Slaughtered Swine” Veterinary Research Communications, 31 (Suppl.1) 233-236

Hughes, B.O. (1976) “Behaviour as an index of welfare” Proc. V European Poultry Conf., 1005-1018

Meriardi 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.

Reg.CE 854/2004 ALLEGATO I, SEZIONE IV REQUISITI SPECIFICI; CAPO IV SUINI DOMESTICI; punto A ISPEZIONE ANTEMORTEM, paragrafo 4.

Smulders D., Verbeke G. , Mormède P. , Geers R.. (2006) “Validation of a behavioural observation tool to assess pig welfare” Physiology & Behaviour Vol. 89, Iss. 3, 438–447

Welfare Quality® Protocol, (2009) “Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs)” Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands, 122 pp.

Tab. 1 - Osservazioni di tipo ABM eseguite al macello raggruppate nei 5 principi e modalità di classificazione
Tab. 1 - *ABM observations executed to slaughter grouped into 5 principles and classification methods*

PRINCIPI	OSSERVAZIONI	CLASSIFICAZIONE
Appropriate behaviour:	Riluttante al movimento	soggetto che si blocca per più di 2 secondi, non muove il corpo e non muove la testa e non esplora
	Torna indietro	soggetto che nella zona di scarico (rampa) torna indietro sul camion
Good feeding:	Non uniformità di taglia	soggetti con evidente difformità in catena di macellazione
	Numero di lettere diverse presenti nella partita	lettere stampigliate nel tatuaggio presente sulla coscia (identificativo del mese di nascita)
Good housing	Bursite 1	presenza di una singola bursite 3-5cm o piccole (1-2cm) bursiti multiple sullo stesso arto
	Bursite 2	singola bursite molto grande >7cm, qualsiasi bursite erosa o bursiti multiple tra 3-5cm
	Imbrattamento fecale 1	superficie cutanea interessata 10-30%
	Imbrattamento fecale 2	superficie cutanea interessata >30%
Good health-lesioni	Zoppia 1	severamente zoppo, minimo carico sull'arto coinvolto
	Zoppia 2	mancato appoggio dell'arto coinvolto e/o inabilità alla deambulazione
	Lesioni orecchio	esiti di ferite, es. necrosi dell'orecchio e otoematoma
	Lesioni alla coda	ferite o infezioni alla coda con escara
	Ferite corpo* lievi	5-10 lesioni da 1 a massimo 5 zone (WQ, 2009)
	Ferite corpo* gravi	> 10 lesioni su almeno 2 zone o >15 lesioni su una sola zona
	* ferite corpo: 1 lesione =1 ferita<2cm o un graffio>2cm o 2 graffi paralleli con massimo 0,5 cm di distanza; 5 lesioni= 1 ferita tra i 2 e i 5 cm 16 lesioni= una ferita profonda>5cm	
Good health-sanità	Dermatite	dermatiti > al 10% della superficie corporea interessata
	Infezioni 1	gonfiori visibili senza evidenza d'inflammazione o 1 piccolo ascesso visibile
	Infezioni 2	singolo ascesso > 5cm o piccoli ascessi multipli
	Ernia 1	ernia visibile di piccole dimensioni che non interferisce con la deambulazione e non erosa
	Ernia 2	ernia di grandi dimensioni che interferisce con la deambulazione o qualunque ernia erosa o sanguinante
	Diarree	% soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
	Prolasso rettale	% soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
	Respiro affannoso	% soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
	Nasi deformi	% soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
	Polmonite	presenza/assenza di qualsiasi segno riferibile a polmonite di qualunque eziopatogenesi
	Pleurite	presenza/assenza di qualsiasi segno riferibile a pleurite di qualunque eziopatogenesi
	Pericardite	presenza/assenza di qualsiasi segno riferibile a pericardite di qualunque eziopatogenesi
	White spot	presenza/assenza di white spot
	Carcasse scartate, morti o soppressi	soggetti arrivati morti allo scarico e/o soppressi d'emergenza e/o carcasse scartate del servizio veterinario

Tab 2 - Prevalenza media delle osservazioni non conformi rilevate sul totale delle 10.085 Ante-mortem (A) e 7.952 Post-mortem (P)

Tab 2 - *The mean value of non-conforming observations collected on a total of 10.085 Ante-mortem (A) and 7.952 Post-mortem (P)*

PRINCIPI	OSSERVAZIONI	A/P	MEDIE %
Appropriate behaviour:	Riluttante al movimento	A	0,42
	Torna indietro	A	0,41
Good feeding:	Non uniformità di taglia	P	2,20
	Numero di lettere diverse presenti nella partita	P	2,79 (n°)
Good housing	Bursite 1	P	21,35
	Bursite 2	P	3,35
	Imbrattamento fecale 1	A	28,36
	Imbrattamento fecale 2	A	19,37
Good health-lesioni	Zoppia 1	A	0,50
	Zoppia 2	A	0,09
	Lesioni orecchio	A	3,05
	Lesioni alla coda	A	0,00
	Ferite corpo lievi	P	2,40
	Ferite corpo gravi	P	0,24
Good health-sanità	Dermatite	P	28,03
	Infezioni 1	P	1,24
	Infezioni 2	P	0,38
	Ernia 1	A	0,25
	Ernia 2	A	0,04
	Diarree	A	0,00
	Prolasso rettale	A	0,00
	Respiro affannoso	A	0,18
	Nasi deformi	A	0,00
	Polmonite	P	17,09
	Pleurite	P	25,78
	Pericardite	P	4,25
	White spot	P	25,39
	Carcasse scartate, morti o soppressi	A/P	0,12

Tab 3 - Punteggi divisi per principi attribuiti al macello per i 15 allevamenti considerati e relativa categoria di valutazione

Tab 3 - Scores divided in to principles and attributed at the slaughterhouse for the considered 15 farms and its assessment category

Allevamento	Good feeding	Good housing	Good health-lesioni	Good health-sanità	Punteggio	Categoria
1	87,22	84,56	92,79	31,02	73,90	ENHANCED
2	75,05	9,68	87,10	31,02	50,71	ACCEPTABLE
3	83,58	30,29	90,58	31,02	58,87	ACCEPTABLE
4	90,47	71,90	81,08	24,99	67,11	ENHANCED
5	46,91	66,03	90,96	37,57	60,37	ACCEPTABLE
6	94,83	30,48	95,95	52,33	68,40	ENHANCED
7	80,88	27,37	85,58	34,23	57,01	ACCEPTABLE
8	64,83	75,55	82,23	34,23	64,21	ACCEPTABLE
9	69,80	55,15	88,10	24,99	59,51	ACCEPTABLE
10	60,38	43,24	89,58	41,04	58,56	ACCEPTABLE
11	57,34	31,98	88,04	31,02	52,10	ACCEPTABLE
12	78,42	92,54	89,77	31,02	72,94	ENHANCED
13	57,34	24,26	88,04	31,02	50,16	ACCEPTABLE
14	69,65	22,88	97,80	24,99	53,83	ACCEPTABLE
15	48,49	50,97	86,71	22,17	52,08	ACCEPTABLE

Tab 4 - Punteggi divisi per principi attribuiti in allevamento per i 15 allevamenti considerati e relativa categoria di valutazione

Tab 4 - Scores divided in to farming attributed principle for the 15 considered farms and its assessment category

Allevamento	Good feeding	Good housing	Good health	Appropriate behaviour	Good health-lesioni	Good health-sanità	Punteggio	Categoria
1	40,16	55,33	53,33	62,85	86,47	50,42	52,92	ACCEPTABLE
2	33,40	22,50	34,76	65,55	85,28	29,76	39,05	ACCEPTABLE
3	81,01	32,50	43,27	56,36	80,71	39,57	53,28	ACCEPTABLE
4	95,26	59,76	37,65	58,62	84,49	33,02	62,82	ENHANCED
5	43,01	44,96	29,69	58,62	85,51	24,17	44,07	ACCEPTABLE
6	81,01	42,60	70,32	67,55	66,50	76,13	65,37	ENHANCED
7	81,01	11,75	48,08	60,69	99,00	43,04	50,38	ACCEPTABLE
8	17,61	29,71	53,70	63,28	85,99	54,22	41,08	ACCEPTABLE
9	18,20	37,54	44,51	58,43	59,31	43,04	39,67	ACCEPTABLE
10	19,04	21,65	53,25	62,85	70,76	62,55	39,20	ACCEPTABLE
11	76,26	35,68	54,79	58,43	99,00	50,42	56,29	ENHANCED
12	81,01	58,92	64,22	66,18	80,71	62,58	67,58	ENHANCED
13	45,86	34,50	44,90	58,43	81,80	50,35	45,92	ACCEPTABLE
14	50,61	20,37	24,28	59,66	80,33	18,73	38,73	ACCEPTABLE
15	35,41	35,57	35,09	53,44	81,80	29,80	39,88	ACCEPTABLE

Tab. 5 - Correlazione tra i punteggi ottenuti al macello e in allevamento nei 15 allevamenti considerati

Tab. 5 - *Correlation between scores obtained at the slaughterhouse and on the farm in the 15 considered farms*

Correlazione	Correlazione	Correlazione	Regressione	Analisi della varianza
	R		R ² corretto	Significatività F
Punteggio finale macello-allevamento	0,63	alta	0,35	0,011
Punteggio Good feeding macello-allevamento	0,55	media	0,24	0,035
Punteggio Good housing macello-allevamento	0,74	alta	0,51	0,002
Punteggio Good health-lesioni macello-allevamento	0,33	bassa	0,04	0,231
Punteggio Good health-sanità macello-allevamento	0,67	alta	0,40	0,006

INDAGINI SULLA CORRELAZIONE TRA LO SCHIACCIAMENTO DEI SUINETTI IN SALA PARTO E LE LESIONI PODALI NELLE SCROFE

STUDY ON THE RELATIONSHIP BETWEEN THE POST-FARROW CRUSHING OF PIGLETS AND FOOT LESIONS OF SOWS

ZOLIN C.¹, COSTA A.², DE FAVERI E.³, SALA V.¹

¹ *Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica – Università di Milano;*

² *Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare – Università di Milano;* ³ *Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche – Università di Milano*

Parole chiave: scrofa, lesioni podali, suinetto, schiacciamento.

Key words: sow, podal lesions, piglet, crushing.

Riassunto

La mortalità di ciclo è una delle principali cause di mancato reddito negli allevamenti suinicoli. Le soluzioni al problema sono già state individuate nelle fasi post-svezzamento, con misure sanitarie, gestionali e con una maggior cura delle strutture. Poco è stato fatto nel periodo neonatale (nei primi 3-7 giorni di vita), dove la mortalità assume un peso rilevante sulle perdite totali (fino all'11%). Una delle possibili cause è lo schiacciamento da parte della scrofa durante i primi giorni di vita, evento che potrebbe verosimilmente essere favorito dalla presenza di lesioni dei piedi delle scrofe stesse. L'obiettivo di questo lavoro sperimentale è stato individuare i fattori di rischio e le principali cause del problema, ponendo particolare attenzione alle patologie podali delle scrofe, per verificare se e quanto queste possano incidere sulla perdita di suinetti. In effetti, le lesioni podali possono incidere sia sulle perdite in sala parto (in modo particolare nei primi giorni di vita ma anche nel periodo successivo), sia sulla numerosità degli svezzati; non sono certamente l'unico elemento condizionante, ma il loro ruolo è statisticamente verificabile. L'applicazione di un sistema di punteggio delle lesioni podali ha infine dimostrato che le lesioni anteriori sono più rilevanti di quelle posteriori e ciò potrebbe motivare altre indagini sul meccanismo di coricamento e levata delle scrofe come una delle cause dello schiacciamento.

Summary

The cycle mortality is a major cause of productive losses in the pig farming. The solutions to the problem have already been identified in the post-weaning stages, with sanitation, management and increased care of the facilities. Little has been done in the neonatal period (in the first 3-7 days of life), where mortality assumes a significant weight on the total losses (11%). One possible cause is the crushing of piglets during the first days of life, an event that is likely to be favored by the presence of lesions of the feet of the sows. The objective of this experimental study was to identify the risk factors and the main causes of the problem, paying particular attention to diseases podal sows, to see if and how these may affect the loss of piglets in farrowing room. In fact, the foot lesions can affect both neonatal losses (especially in the first days of life but also in the next period), both the number of weaned pigs. They are not the only influencing factor, but their role is statistically verifiable. The application of a scoring system of foot lesions has finally shown that the front legs lesions are more relevant than the rear ones and this could motivate other investigations on the mechanism of lying and raising of sows as one of the causes of crushing.

INTRODUZIONE

Le perdite produttive ed economiche in suinicoltura sono correlate al tasso di mortalità e al ritardo di crescita; quest'ultimo è principalmente ascrivibile agli errori gestionali, spesso amplificati da strutture inadeguate al potenziale genetico dei suini, ma un ruolo decisivo va attribuito anche alle patologie condizionate della fase di finissaggio.

Considerando nel suo insieme la mortalità di ciclo, quella dei suinetti nel periodo che va dalla nascita allo svezzamento è ancora preponderante, ma la fase più critica è quella neonatale, corrispondente alla prima settimana di vita.

Analogamente a quanto accade nelle altre specie, anche quella suina è caratterizzata da una propria mortalità peri-parto, dovuta a determinanti specifiche, intimamente legate alla fisiologia e all'etologia di specie, modulate e amplificate dalla gestione aziendale. Secondo i dati presenti in letteratura, la mortalità peri-parto nella specie suina si attesterebbe tra l'11,5 e il 18,6 %, con una variabilità che è funzione del Paese in cui è valutata (Koketsu *et al.*, 2006). Tali valori vanno certamente considerati con attenzione, poiché la redditività aziendale è strettamente connessa al numero di suinetti svezzati per anno (Dial *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1990).

Il numero medio di nati per scrofa si aggira attorno a 12 con punte fino a 20, ma le perdite prima dello svezzamento possono variare tra il 5 e il 25% (Andersen *et al.*, 2004); nei primissimi giorni dopo il parto, lo schiacciamento e la morte per mancanza di alimento rappresentano insieme il 50-80% di tutti i decessi (Fraser, 1990; Jarvis *et al.*, 2005).

Lo schiacciamento dei suinetti è in buona sostanza il risultato di un'interazione non corretta tra il suinetto, il comportamento della madre e l'ambiente in cui essi convivono (Marchant *et al.*, 2001; Sala, 2005); alla nascita, infatti, i piccoli arrivano a all'incirca 1 kg, ma condividono una piccola area con la madre che ne pesa circa 200-250. Se si considera tale differenza, non c'è da stupirsi che uno dei principali fattori di mortalità nel periodo parto-svezzamento sia proprio lo schiacciamento da parte della madre stessa (Fraser, 1990; Sala e Fantinati, 2012). Perché questa dinamica avvenga, il suinetto si dovrà trovare vicino alla madre mentre questa compie dei movimenti tali da intrappolarlo tra il proprio corpo e il pavimento o una parete e/o struttura della gabbia di parto; in queste condizioni, è impossibile che il lattonzolo sopravviva a lungo sotto un peso enormemente superiore al suo. Talvolta, invece, le grida del piccolo sono in grado di far spostare o rialzare prontamente la madre e, se il tempo di schiacciamento non è stato eccessivo e la posizione non pericolosa, il suinetto non riporterà danni permanenti.

La posizione e il tempo di permanenza sotto il corpo della madre, dunque, sono elementi molto importanti, tanto che molti suinetti muoiono in pochi minuti soprattutto per soffocamento, mentre solo pochi per le fratture e le lesioni riportate (Weary *et al.*, 1996a; Wechsler e Hegglin, 1997). Guardando il problema dal punto di vista meccanico, va ricordato che esistono vari movimenti attraverso cui la scrofa arriva a schiacciare i suinetti, ma sono poche le indicazioni bibliografiche al riguardo (Weary *et al.*, 1996a).

Numerosi studi confermano la correlazione tra l'età delle scrofe, il livello di carriera e la vitalità neonatale dei suinetti, ma anche il tempo intercorrente tra l'inizio e la fine del parto è un fattore critico; i parti languidi, infatti, si associano non solo a un aumento dei nati morti, ma anche a una ridotta vitalità che innalza pericolosamente il rischio schiacciamento (Fantinati, 2011).

Un altro elemento da considerare è certamente quello riguardante la durata della lattazione: i maggiori rischi di mortalità sono associati alle figliate che rimangono sotto scrofa più a lungo, perché ciò comporta un maggiore tempo di contatto, incrementando le possibili occasioni di schiacciamento.

Altri fattori, per lo più sottovalutati o addirittura non considerati, sono le patologie podali; con questa definizione s'intende un complesso di lesioni che solo nei casi più gravi esitano in zoppia, anche perché le scrofe sono animali particolarmente resistenti al dolore. La lesione più comune è l'ipercheratosi del cuscinetto plantare, spesso correlata a traumatismi da pavimentazione; le fratture della suola e/o del tallone sono invece dovute a dimensioni scorrette delle fessure del grigliato, in cui gli unghielli possono rimanere intrappolati. Le separazioni lungo la linea bianca sono anch'esse riportabili all'eccessiva pressione dovuta al peso della scrofa su pavimentazioni traumatizzanti, mentre le fratture (orizzontali o verticali) della parete dell'unghia sono frequenti in situazioni di crescita eccessiva associata ad ipo-consumo. Infine, l'eccessiva lunghezza degli unghielli principali o degli unghielli accessori (speroni) è riportabile all'immobilità protratta della scrofa.

In tutte le lesioni, non sono da sottovalutare le infezioni secondarie, soprattutto se coinvolgono le strutture articolari, aggravando ulteriormente il quadro; i batteri che vi partecipano sono diversi e spesso associati in modo imprevedibile e ciò complica non poco la diagnosi.

Anche i fattori condizionanti sono variabili e di natura ambientale, manageriale, genetica e alimentare; sono particolarmente importanti le pavimentazioni e anche la permanenza continua su superfici bagnate e imbrattate di feci o urine, può ridurre progressivamente la consistenza delle strutture podali, con conseguente rammollimento dello strato corneo, che diventa più vulnerabile.

Resta invece in discussione il ruolo della genetica, già dimostrato per l'ostecondrosi; per una parola definitiva sarebbe necessario considerare le caratteristiche morfologiche dei fenotipi interessati. Infine, alle lesioni possono contribuire anche fattori nutrizionali di diversa natura. Per poter identificare quali tipologie di lesione hanno un'effettiva associazione con la zoppia, è stato messo a punto un sistema che consente di assegnare un punteggio a ciascun piede secondo una scala a tre valori corrispondenti alla gravità della lesione (1 = lieve, 2 = moderata, 3 = grave; Deen *et al.*, 2008a,b).

La gravità e l'importanza del problema sono testimoniate dal fatto che una delle principali cause di eliminazione delle scrofe riproduttrici, a volte anche prima della loro carriera riproduttiva, è rappresentata proprio dai problemi locomotori, definiti spesso genericamente "zoppie" (Anil *et al.*, 2007).

Pertanto, trattamento e prevenzione delle patologie podali costituiscono interventi indispensabili per il mantenimento di uno standard produttivo elevato nella scrofaia limitando al contempo le perdite economiche. E' dunque necessario valutare attentamente le lesioni e quantificarne l'effettiva rilevanza applicando i sistemi di punteggio sopra descritti per avere indicazioni oggettive del problema.

Molto si è fatto per controllare e ridurre la mortalità nel periodo del post-svezzamento, con misure sanitarie, gestionali e con una maggior cura delle strutture, sia nella fase di svezzamento, sia nel magronaggio e nell'ingrasso. Resta invece ancora un ampio margine d'intervento sulla mortalità neonatale (nei primi 3-7 giorni di vita), che assume un peso piuttosto rilevante sulle perdite totali (11%).

L'obiettivo di questo studio sperimentale è dunque individuare i fattori di rischio e le principali cause del problema, ponendo particolare attenzione alle patologie podali delle scrofe e alla loro correlazione con lo schiacciamento, per verificare se e quanto queste possano incidere sulla perdita di suinetti in sala parto.

Considerando gli attuali margini economici del settore suinicolo, una valutazione mirata delle cause di schiacciamento potrebbe consentire un miglioramento della produttività delle sale parto e quindi, attraverso una migliore qualità degli svezzati, di tutto il ciclo di allevamento.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta selezionando due aziende suinicole a ciclo chiuso aventi rispettivamente 600 e 450 scrofe di genetica italiana. La gestione riproduttiva delle scrofaie prevede i primi 40 giorni di gestazione in gabbia singola e poi le scrofe sono trasferite in gruppo. I parti sono naturali e la lattazione dura circa 4 settimane. Le scrofe ricevono due volte al giorno alimento semi-liquido.

Per quanto riguarda le strutture di gestazione, i pavimenti sono realizzati in grigliato nella prima fase, mentre nella seconda fase è presente una pavimentazione mista.

In entrambi gli allevamenti sono stati eseguiti tre rilievi successivi su differenti tornate di parto, a una distanza di due mesi l'uno dall'altro, per un totale di 200 scrofe. Nella formazione dei gruppi di valutazione, è stato mantenuto equivalente il numero di primipare e pluripare. Sono state valutate le condizioni dei piedi di ciascuna scrofa, considerando anteriori e posteriori, differenziando il tipo di lesione e assegnando un punteggio a ciascuna; allo scopo, è stata predisposta una tabella che consente di classificare ciascun problema in base alla tipologia e alla gravità.

Per facilitare l'indagine statistica, le lesioni sono state poi suddivise in anteriori e posteriori; è stata poi considerata la lesione prevalente negli arti anteriori piuttosto che nei posteriori e quella predominante in ciascuna azienda.

I suinetti di ciascuna figliata sono stati monitorati dal parto fino allo svezzamento, registrando diversi parametri: nati vivi, mummificati e nati morti, schiacciati, vivi dopo tre giorni, numero complessivo di morti prima dello svezzamento e suini svezzati.

È stata infine analizzata su base statistica la correlazione tra le lesioni podali delle scrofe (totali, anteriori e posteriori) e il numero di suinetti schiacciati, vivi dopo tre giorni e svezzati, utilizzando il software sas 9.3 (SAS Inc., 2013).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

I risultati complessivi delle lesioni podali nelle due aziende sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Lesioni podali nelle due aziende.

Table 1. Podal lesions in the two farms.

	Allev. A	Allev. B
Punteggio negativo	40	55
Primipare	25	28
Pluripare	15	27
	Allev. A	Allev. B
Punteggio positivo	160	145
Primipare	54	42
Pluripare	106	103

Emerge subito chiaramente come, tra le scrofe senza lesioni, siano in netta prevalenza le primipare, specialmente nell'azienda A. Le scrofe maggiormente affette da lesioni sono viceversa le pluripare, in entrambe le situazioni.

Il numero di nati vivi per ciascuna figliata è stato simile in entrambi gli allevamenti, sia tra le scrofe con lesioni, sia tra quelle senza; anche i numeri che si riferiscono ai feti mummificati e ai suinetti nati morti, come pure quelli che sopravvivono fino al terzo giorno sono sovrapponibili tra le scrofe senza patologie podali. Questo rappresenta un dato positivo, perché attesta che le due realtà sono omogenee, avvantaggiando l'analisi statistica nel momento dell'assemblaggio dei dati.

Le lesioni podali rilevate sono state quindi classificate mediante il sistema sviluppato da *Zinpro* e i punteggi ottenuti nei due gruppi si attestavano tra 1 e 5 per i piedi anteriori e tra 1 e 10 per i posteriori.

La presenza di più di una lesione su uno stesso piede non ha permesso per il momento di rintracciare la correlazione tra un tipo specifico di problema e il danno al suinetto.

Indagando quale fosse la tipologia di lesione predominante, è emerso che l'ipercheratosi del cuscinetto plantare, spesso associata a erosione, è quella più diffusa, sia a carico degli anteriori che dei posteriori, seguita dall'eccessiva crescita degli unghia.

Questo quadro potrebbe essere spiegato dalle recenti modifiche nella gestione delle scrofe durante il periodo della gestazione. Dal 2013, infatti, negli allevamenti europei è stata ridotta la permanenza delle scrofe in gabbia singola aumentando invece quella in box di gruppo (Dir. 2008/120/CE; D.Lgs. 7 luglio 2011, n. 122); ciò ha comportato una riduzione dell'ipercheratosi in seguito ad una maggiore usura della suola durante il movimento, ma anche ad un peggioramento delle lesioni da eccessiva crescita eventualmente presenti.

Un'altra lesione frequentemente rilevata è l'eccessiva lunghezza degli unghia accessori, specialmente a carico dei posteriori, dove gli unghia accessori crescono di più. Le fratture orizzontali e verticali della parete e le separazioni a livello della linea bianca sono più frequenti negli arti posteriori, in particolare nelle scrofe pluripare.

È importante ricordare la correlazione diretta tra queste lesioni e lo stato della pavimentazione, specie se in grigliato. In nessuna di queste aziende, invece, sono stati rinvenuti casi di flemmoni al cerchio coronario.

Nella seconda parte di questo lavoro sono state analizzate le lesioni podali e i punteggi in relazione ai differenti parametri misurati, con lo scopo di identificare la significatività statistica delle correlazioni.

Quest'operazione è stata condotta in modo particolare sugli indicatori della produttività della scrofa in sala parto; obiettivo finale di questa ricerca, infatti, è la dimostrazione dell'impatto economico delle lesioni podali, in modo specifico in termini di nati vivi e suinetti svezzati. Fornire un quadro più chiaro di questa problematica e delle sue implicazioni pratiche potrà dunque contribuire ad accrescere la sensibilità degli allevatori rispetto alle patologie podali e al benessere e produttività della scrofa.

La raccolta dei dati in sala parto ha permesso di evidenziare che le pluripare hanno un numero più alto di nati vivi, di suinetti vivi a tre giorni dal parto e di svezzati. La mortalità totale è stata leggermente più alta tra le figlie delle pluripare, ma l'elevato numero di nati consente di avere comunque più svezzati.

Un livello elevato di efficienza in sala parto è correlato statisticamente con il numero di suinetti nati vivi, con una ridotta natimortalità e con un aumento del numero di suinetti vivi al terzo giorno ($P < 0.001$ per tutti i valori).

Figura 1. Relazioni tra punteggi podali e suinetti nati vivi
(0-5 = punteggio; 0-16 = suinetti).

Figure 1. Correlation between podal scores and piglets born alive
(0-5 = score. 0-16 = piglets)

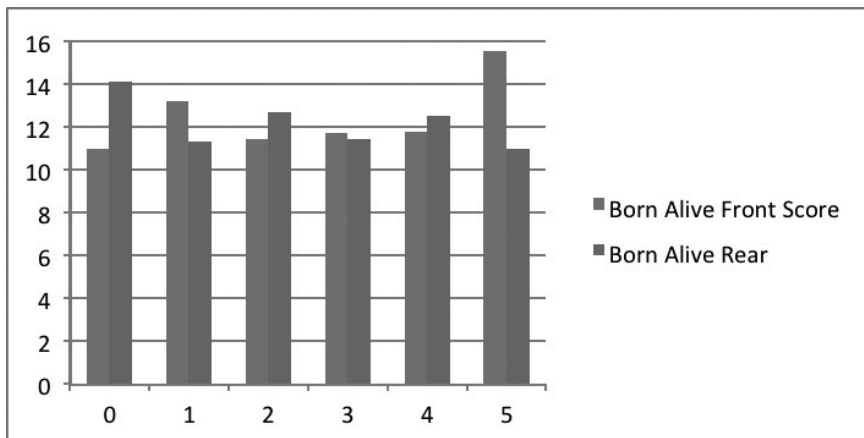


Figura 2. Relazione tra punteggi podali e suinetti vivi al terzo giorno
(0-5 = punteggio; 0-14 = suinetti).

Figure 2. Correlation between podal scores and piglets alive on the third day
(0-5 = score. 0-14 = piglets)

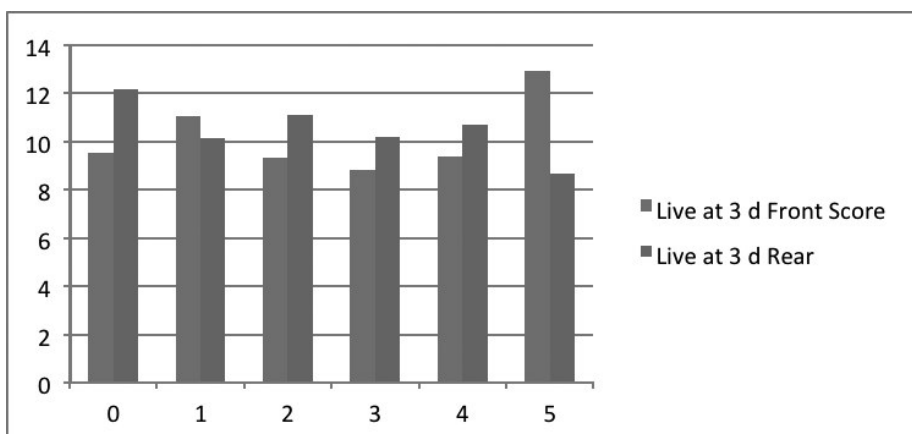


Figura 3. Relazione tra punteggi podali e numero totale di suinetti morti
(0-5 = punteggio; 0-3=suinetti).

Figure 3. Correlation between podal scores and total number of dead piglets
(0-5 = score. 0-3 = piglets)

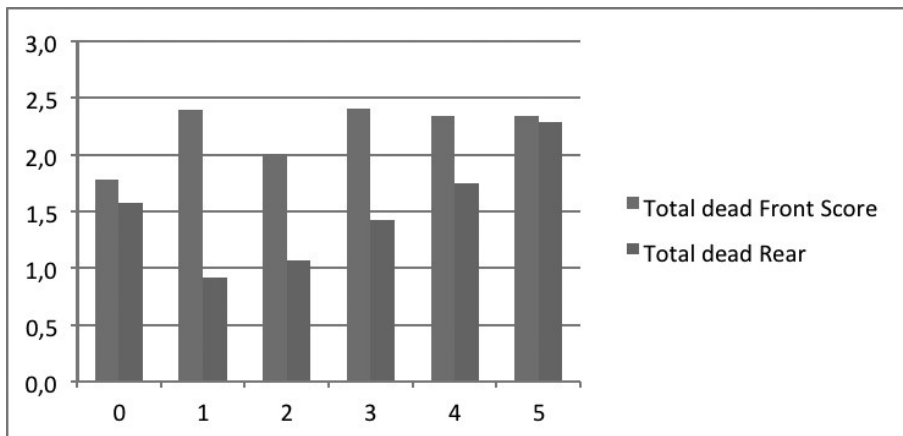
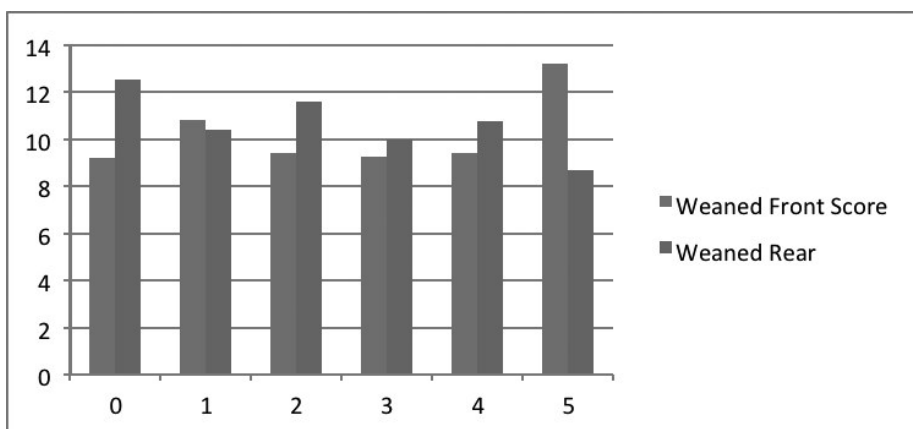


Figura 4. Relazione tra punteggi podali e suinetti svezzati
(0-5 = punteggio; 0-14 = suinetti).

Figure 4. Correlation between podal scores and weaned piglets
(0-5 = score. 0-14 = piglets)



Confrontando le due aziende, il valore medio dei suinetti schiacciati è maggiore nell'allevamento A (1.84) rispetto all'allevamento B (1.50). Sia nelle primipare, sia nelle pluripare, si trovano infatti lesioni podali numerose e più gravi; le differenze tra le due realtà sono statisticamente significative ($P < 0.001$).

La correlazione tra lo schiacciamento e le lesioni podali è maggiore per gli arti anteriori rispetto ai posteriori; ad esempio, considerando i due valori più elevati (grado 5) troviamo 2.15 suinetti schiacciati per gli anteriori e 1.81 per i posteriori. Anche in questo caso, la differenza è statisticamente significativa ($P < 0.001$).

Inoltre si è visto come differenti combinazioni di punteggi podali anteriori e posteriori abbiano significatività statistica se comparate allo schiacciamento.

Figura 5. Relazione tra punteggi podali e suinetti schiacciati
(0-5 = punteggio; 0-3 = suinetti).

Figure 5. Correlation between podal scores and crushed piglets
(0-5 = score. 0-3 = piglets)

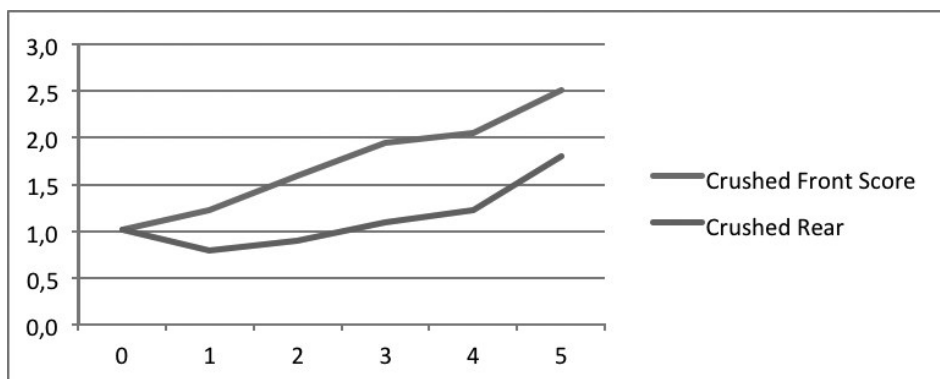


Tabella 2. Combinazione di punteggi podali anteriori e posteriori e livelli di significatività.**Table 2.** Combination of front and rear scores with significance levels.

Front	Rear	Crushed	Standard	Pr > t
0	1	0,167	0,245	0,497
0	2	0,220	0,064	0,0006
0	0	0,308	0,062	<.0001
0	4	0,511	0,089	<.0001
0	3	0,688	0,347	0,0482
0	5	0,926	0,190	<.0001
1	1	0,229	0,200	0,2528
1	2	0,413	0,269	0,1254
1	4	0,921	0,230	<.0001
1	3	1,021	0,347	0,0035
2	2	0,760	0,228	0,001
2	3	0,770	0,177	<.0001
2	4	1,058	0,127	<.0001
2	5	2,064	0,349	<.0001
3	2	0,669	0,228	0,0037
3	4	2,000	0,425	<.0001
3	5	2,936	0,602	<.0001
4	4	1,064	0,602	0,0779
4	5	2,064	0,602	0,0007
5	5	2,564	0,302	<.0001

Le lesioni podali anteriori sono correlate in modo statisticamente significativo con i suinetti nati vivi, schiacciati e svezzati ($P < 0.001$ per tutti i parametri). Quelle che coinvolgono i posteriori, invece, sono correlate statisticamente con il numero di suinetti nati vivi, schiacciati, vivi al terzo giorno, morti pre-svezzamento e totali, svezzati ($P < 0.001$ per tutti i parametri).

Tabella 3. Livelli di significatività dei diversi parametri misurati.

Table 3. Levels of significance of the various measured parameters.

	Born Alive	Stillb + Mumm	Crushed	Live 3 d	D b w	D Tot	Weaned
Farrow	<0.001	<0.001	NS	<0.001	<0.001	<0.01	NS
Front Score	<0.001	NS	<0.001	<0.05	NS	NS	<0.001
Rear Score	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Notes. Dbw = Dead before weaning – D Tot = Total Dead

CONCLUSIONI

L'indagine sperimentale di cui riportiamo i risultati è stata complessa ed impegnativa. In particolare, richiedono ulteriore impegno individuazione e correlazione di altri parametri produttivi con le lesioni podali.

Mentre il legame diretto con lo schiacciamento è facile da comprendere, è più complesso capire in che misura le lesioni podali, compromettendo il benessere della scrofa, possano causare modificazioni nella vitalità dei suinetti e condizionarne la sopravvivenza durante il periodo di lattazione (Sala, 2005).

In ogni caso, crediamo di aver dimostrato come le lesioni podali possano incidere sia sulle perdite in sala parto (in modo particolare nei primi giorni di vita ma anche nel periodo successivo), sia sulla numerosità degli svezzati; non sono certamente l'unico elemento condizionante, ma il loro ruolo è statisticamente verificabile.

Un altro elemento di novità è l'applicazione del sistema di punteggio anche agli arti anteriori, ottenendo risultati non attesi; infatti, in relazione ad alcuni aspetti del danno produttivo, le lesioni anteriori si sono dimostrate più rilevanti di quelle posteriori e ciò potrebbe motivare altre indagini sul meccanismo di coricamento e levata delle scrofe come una delle cause dello schiacciamento (Bonde *et al*, 2004).

Al di là della difficoltà di collegare la tipologia della lesione a una specifica perdita produttiva, poiché spesso sono presenti lesioni diverse su ciascun piede o anche su uno stesso piede della scrofa, riteniamo che qualora vi fosse un interesse specifico per una determinata lesione quest'obiettivo possa essere raggiunto.

Tra le possibili soluzioni, una strada percorribile per ridurre l'incidenza del problema sarebbe intervenire sull'alimentazione, somministrando integrazioni di oligoelementi (zinco e rame) in forma colloidale, che rafforzino lo strato corneo. Sarebbe inoltre importante individuare un metodo per controllare il benessere delle scrofe in gestazione; infatti, eventuali condizioni inidonee delle strutture e/o degli ambienti possono produrre stress a livelli elevati o addirittura generare sofferenza a seguito di traumi o ferite, delle scrofe o dei suinetti, con mortalità nei casi più gravi.

Infine, crediamo che questi primi risultati possano rappresentare un importante punto di partenza per l'organizzazione della prevenzione e del controllo delle perdite in sala parto; a questo fine sarà indispensabile tenere conto dei costi produttivi delle criticità, delle possibili azioni correttive e dei benefici, non soltanto economici, conseguenti alla loro applicazione.

Su queste basi è fondamentale rivalutare qualità e prevalenza dei fattori di rischio, fino ad individuare alcuni punti critici di controllo nelle diverse fasi pre-parto, parto e post-parto, in una prospettiva di piano HACCP; i dati generati secondo questo schema permetterebbero di

valutare le prestazioni dell'azienda, ma anche di confrontarle con quelle di realtà analoghe. In ultima analisi e per finire, l'individuazione sistematica e analitica dei fattori predisponenti e delle soluzioni idonee a diminuirne il danno rappresenta l'unico modo di migliorare qualità ed esito della gestione aziendale (Sala e Fantinati, 2012) soprattutto per salvaguardare la redditività di una produzione di grande importanza e tradizione nel nostro Paese.

BIBLIOGRAFIA

- Andersen I.L., Berg S., Bøe K.E. (2005). Crushing of piglets by the mother sow (*Sus scrofa*) purely accidental or a poor mother? *Applied Animal Behaviour Science*, 93: 229-243.
- Anil S.S., Anil L. & Deen J. (2007). Factors associated with claw lesions in gestating sows. *Swine Health and Production*, 15: 78-83.
- Bonde M., Rousing T., Badsberg H., Sørensen J. (2004). Associations between lying-down behavior problems and body condition, limb disorders and skin lesions of lactating sows housed in farrowing crates in commercial sow herds. *Livestock Production Science*, 87: 179-187.
- Deen J., Schuttert M., van Amstel S., Ossent P., van Barneveld R. and Zinpro Corporation (2008a). Feet First lesion scoring guide, produced by the *Feet First Project*.
- Deen J. and Winders M. (2008b). Development of a claw lesion scoring guide for swine. *Proceedings of the 20th IPVS Congress*, Durban, South Africa. Page 579.
- Dial G.D., Marsh W.E., Polson D.D., Vaillacourt J.P. Reproductive failure: differential diagnosis, In *Diseases of Swine*, 7th ed. (Leman, A.L., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S., and Taylor, D.J.eds.), Iowa State University Press, Ames, pp. 88-137.
- Fantinati P. (2011). Dossier salute della scrofa: costipazione un problema controllabile. Supplemento all'Allevatore Magazine, 5.
- Fraser D., Kramer D.L., Pajor E.A., Weary D.M. (1995). Conflict and cooperation sociobiological principles and the behavior of pigs. *Applied Animal Behavior Science*, 44: 139-157.
- Fraser D. (1990). Behavioral perspectives on piglet survival. *Reprod. Fert., Suppl. N.* 40: 355-370.
- Jarvis S., D'Eath R.B., Fujita K. (2005). Consistency of piglet crushing by sows. *Animal Welfare*, 14: 43-51.
- Koketsu Y., Takenobu S., Nakamura R. (2006). Preweaning Mortality Risk and Recorded Causes of Death Associated with Production Factors in Swine Breeding Herds in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 68 (8): 821-826.
- Marchant J.N., Broom, D.M. Corning S. (2001). The influence of sow behavior on piglet mortality due to crushing in an open farrowing system. *Animal Science*, 72: 19-28.
- Sala V. (2005). Pre-parto, ambiente di parto e qualità dei suinetti. *Summa Animali da Reddito*, 22 (7): 53-58.
- Sala V., Fantinati P. (2012). Implicazioni manageriali e strutturali nello schiacciamento dei suinetti. *Summa Animali da reddito*, 29 (6): 30-34.
- Stein T.E., Duffy S.J., Wickstrom S. (1990), "Differences in production values between high and low productivity swine breeding herds", *Animal Science* 68: pp. 3972-3979.
- Weary D.M., Pajor E.A., Fraser D., Honkanen A. (1996), "Sow body movements that crush piglets: a comparison between two types of farrowing accommodation", *Applied Animal Behaviour Science*, N. 49, pp. 149 – 158.
- Wechsler B., Hegglin D. (1997), "Individual differences in the behaviour of sows at the nest-site and the crushing of piglets", *Applied Animal Behaviour Science*, N. 1, pp. 39-49.

POLMONITE ENZOOTICA E LESIONI AL MACELLO: STUDIO PRELIMINARE SULLA CORRELAZIONE FRA PUNTEGGIO MADEC, PERCENTUALE DI TESSUTO POLMONARE COLPITO E PERDITA ECONOMICA

ENZOOTIC PNEUMONIA AND EVALUATION OF THE LUNG LESIONS AT THE ABATTOIR: PRELIMINARY STUDY ON THE CORRELATION AMONG MADEC SCORE, LUNG LESIONS AND ECONOMIC LOSSES.

SALVINI F. *, GUADAGNINI G. *, PAOLETTI F. *, BRESAOLA M. *, OTTOLINI F. *,
GIBELLINI MV. °, MAZZONI C. **, SCOLLO A. **, AMORICO A. **

** Pig Vet, Brescia; ° Elanco AH; ** Suivet, Reggio Emilia*

Parole chiave: Polmonite Enzootica, Mycoplasma hyopneumoniae, punteggio Madec, tessuto colpito, perdita economica

Key words: Enzoootic pneumonia, Mycoplasma hyopneumoniae, Madec scoring, Lung lesion, Economic losses

Riassunto

Nel presente lavoro sono state valutate 413 partite di suini, provenienti in prevalenza da allevamenti del nord Italia e macellati in un macello industriale dell'emilia romagna nel periodo Marzo-Dicembre 2014. Per ogni partita sono stati valutati i seguenti parametri: punteggio Madec, percentuale di tessuto polmonare colpito sui suini affetti da lesioni, perdita economica per ogni capo macellato di ogni singola partita.

I dati scaturiti da queste valutazioni, sono stati elaborati statisticamente, al fine di valutare se ci fosse una significativa correlazione fra i tre parametri considerati. Tale correlazione è risultata significativa.

E' stata anche valutata la correlazione fra punteggio Madec e perdita economica per capo macellato, cercando di creare un dato facilmente valutabile e fruibile.

Abstract

In this study 413 batches of pigs coming from farms in northern Italy and slaughtered in an Emilia Romagna slaughterhouse in the period from March to December 2014 were evaluated. For each batch were assessed the following parameters: Madec score, percentage of lung tissue affected in swine with lesions, economic loss for each animal slaughtered in every batch.

The resulting data were statistically processed in order to assess a significant correlation between the three considered parameters.

This correlation was significant.

Correlation between score Madec and economic loss per slaughtered animal was also evaluated with the aim to create an assessable and usable data.

INTRODUZIONE

La polmonite enzootica è una malattia respiratoria cronica diffusa in tutti i paesi produttori di suini che causa ingenti perdite economiche per effetto di aumenti dei costi di medicazione e di riduzione delle performance di accrescimento e conversione alimentare (Maes D., 2013).

Analogamente a quanto avviene in altri paesi, anche in Italia, si ritiene che l'infezione da *M.hyopneumoniae* sia responsabile di ingenti dispendi derivanti dalla riduzione degli incrementi ponderali giornalieri degli animali infetti, dalla riduzione dell'efficienza alimentare, dall'instaurarsi di infezioni secondarie e dall'aumento dei costi dovuto alla necessità di effettuare trattamenti terapeutici sugli animali. (Ross R. 1999, Gusmara C. 2003, Straw B. 1989, Maes D. 1996). Negli anni sono stati elaborati diversi metodi per la quantificazione economica dei danni imputabili alle patologie e la polmonite enzootica, da questo punto di vista, gode di un'attenzione particolare.

Straw, nel 1989, ha elaborato una tabella in base alla quale viene stimato un danno zootecnico relativo alla percentuale di polmone colpito da *Mycoplasma hyopneumoniae*. Questi stessi dati sono stati più volte confermati da ulteriori lavori presenti in bibliografia (Maes D, 1996). Nonostante si tratti di dati riferiti al suino leggero, questi presupposti sono stati utilizzati anche nel nostro lavoro su animali pesanti, per valutare l'impatto zoo economico che la malattia può determinare nelle nostre condizioni di allevamento. E' evidente che eventuali reinfezioni tardive o risoluzione di infezioni recenti, potrebbero compromettere il singolo dato, ma è altrettanto evidente che un numero così significativo di suini analizzati, ci permette di valutare con buonissima approssimazione il dato globale.

Se i dati rilevati al macello e valutati secondo lo schema Madec vengono incrociati e rielaborati con calcoli matematici presenti in bibliografia (Dottori M, 2007), è possibile calcolare il danno economico che la polmonite enzootica può causare (Salvini F., 2014).

Gli scopi di questo lavoro sono: a) valutare correlazioni esistenti tra l'estensione delle lesioni polmonari rinvenute al macello sui suini colpiti, la perdita economica per capo caricato e il punteggio Madec assegnato alla partita; b) valutare eventuali variazioni dei precedenti fattori in relazione alla stagionalità; c) stabilire una correlazione fra punteggio Madec e perdita economica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo compreso tra Marzo e Dicembre 2014, 413 partite composte da 140 suini, provenienti da varie aziende del nord Italia diverse fra loro per tipologia di allevamento e trattamenti vaccinali sono state regolarmente macellate e sottoposte a score polmonare utilizzando la griglia Madec.

I dati raccolti sono stati, a seconda del periodo in cui è avvenuta la macellazione, divisi in due gruppi: uno relativo ai mesi estivi di ristallo (aprile, maggio e giugno, corrispondenti alle macellate di ottobre, novembre e dicembre), e il secondo relativo ai mesi invernali (novembre, dicembre e gennaio, corrispondenti alle macellate di maggio, giugno e luglio). Per ciascuna partita, oltre al punteggio Madec, è stata calcolata la media delle lesioni in funzione della percentuale di superficie polmonare colpita e la perdita economica per suino imputabile all'infezione da *M.hyopneumoniae*.

Calcolo del punteggio Madec

Lo score polmonare o "quantificazione della gravità delle lesioni" è stato effettuato utilizzando il sistema descritto da Madec and Kobish (Madec F., Kobish M., 1982) secondo il seguente schema: 0 punti in assenza di lesioni, 1 punto se la lesione interessa meno del 25% della superficie del lobo polmonare, 2 punti per lesioni interessanti dal 25

al 50% della superficie del lobo polmonare, 3 punti se la lesione polmonare interessa dal 50 al 75% della superficie del lobo polmonare e 4 se interessa oltre il 75%. (Ostanello F., 2006)

Secondo questo schema il punteggio totale ottenibile da 6 lobi polmonari può variare da un minimo di 0 a un massimo di 24.

Calcolo delle lesioni polmonari

Le lesioni sono state valutate in funzione della percentuale di superficie polmonare colpita prendendo in considerazione ciascun lobo in base alla sua importanza relativa e alla percentuale di superficie polmonare rappresentata (Straw, 1986. Dottori, 2007). L'elaborazione della quantità di tessuto polmonare colpito sui capi con lesioni, è stata fatta utilizzando un modello matematico messo a punto da Dottori e coll.(2007). Nella Tabella 1 è mostrato come viene correlato il punteggio Madec valutato nel singolo lobo e la conseguente percentuale di tessuto polmonare colpito.

E' evidente che a parità di punteggio Madec, la percentuale di parenchima polmonare colpito, può essere differente in base alla dimensione del lobo colpito. In tabella 2 è evidenziato come due polmoni con punteggio 5, possono in realtà avere una importante differenza di percentuale di polmone colpito, con conseguenti minori performances zootecniche e maggior perdita economica.

Tab 1: rapporto fra punteggio Madec e percentuale di polmone colpito nei diversi lobi

Tab 1: *relationship between Madec Score and percentage of affected lung in different lobes*

PUNTEGGIO POLMONARE	LOBI ACCESSORI %	LOBI PRINCIPALI %
1	1,25	3,125
2	3,75	9,38
3	6,25	15,6
4	8,75	21,8

Tab 2: Diverse % di tessuto polmonare colpito a parità di punteggio Madec

Tab 2: *Different % of affected lung tissue with same Madec Score*

	RC	RM	RP	A	LC	LM	LP	TESSUTO COLPITO %
SCORE 5	1	1	0	0	1	2	0	
% LESIONE	1.25	1.25	0	0	1.25	3.75	0	7,5
SCORE 5	0	0	2	0	0	3	0	
% LESIONE	0	0	9.38	0	0	6.25	0	15,63

Calcolo delle perdite economiche

I calcoli delle perdite economiche causate da lesioni polmonari riferibili a *M.hyopneumoniae* sono stati condotti utilizzando le formule di Straw, 1980, ipotizzando, per il suino pesante italiano, un IMG di 700 gr, una resa del 28,6% (ICA 3,5) un periodo di permanenza all'ingrasso di 180 giorni, partite da 140 capi e bollettino della settimana di carico.

Il prezzo del suino pesante vivo, nel corso dei mesi è variato da un minimo di 1,36 euro, ad un massimo di 1,609 euro.

In base alle formule di Straw è possibile quantificare una perdita di incremento ponderale in base alla percentuale di lesione, mentre l'aumento della resa alimentare è considerato e valutato solo per lesioni superiori al 7% (Straw B, 1989)

E' evidente che il punteggio 0 corrispondente a totale assenza di lesioni su tutti i maiali del carico, è una condizione mai osservata nelle partite valutate, e quindi in tutte le partite analizzate si parte sempre da una perdita economica.

Analisi statistica

Il software statistico utilizzato è JMP® 9.0.3 (2010 SAS Institute Inc).

Nel corso dell'analisi preliminare ci si è concentrati inizialmente sulla valutazione della distribuzione percentile delle medie dei valori ottenuti da ciascuna partita.

In seguito uno Scatterplox matrix è stato eseguito per la valutazione preliminare delle correlazioni esistenti tra il punteggio Madec, le lesioni polmonari rinvenute e la perdita economica, seguito poi dall'analisi della bivariata, con conseguente calcolo di Rsquare e dall'analisi della varianza.

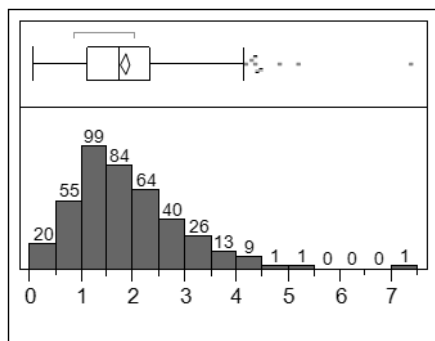
Per valutare eventuali differenze presenti tra i gruppi di medie madec, lesioni polmonari e perdite economiche relativamente ai due periodi osservati, è stata utilizzata l'analisi della varianza (oneway ANOVA), t-test, Tukey-Kramer HSD.

RISULTATI DELL'ANALISI STATISTICA

Distribuzione

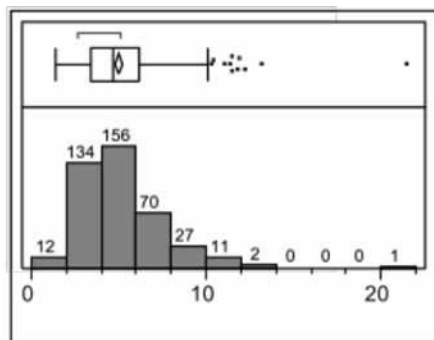
Fig.1: Distribuzione dei punteggi Madec medi di ciascuna partita

Fig. 1: *Madec average distribution for each batch*



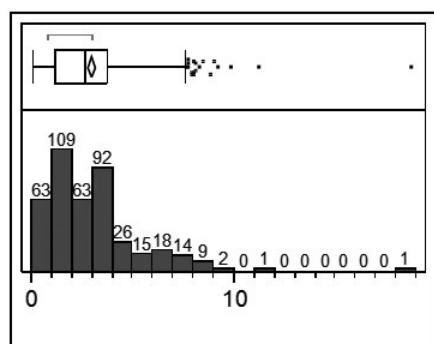
Durante il periodo compreso tra Marzo e Dicembre sono state punteggiate, secondo schema Madec, 413 partite di suini regolarmente macellati. Il punteggio medio ottenuto è 1,84 (min 0,07 e max 7,36). Nel 50% delle osservazioni effettuate, il punteggio Madec è stato inferiore a 1,74 e nel 75% delle osservazioni è stato inferiore a 2,33.

Fig. 2: Distribuzione delle percentuali medie di tessuto polmonare colpito in ogni partita
Fig. 2: Distribution of the average percentaes of lung tissue affected for each batch



Per quanto riguarda il danno tissutale, le lesioni sono state valutate in funzione della percentuale di superficie polmonare colpita prendendo in considerazione ciascun lobo in base alla sua importanza relativa e alla percentuale di superficie polmonare rappresentata (Straw, 1989). Mediamente il danno ha coinvolto il 5,02% di tessuto polmonare (min 1,33% e max 21,44%). Nel 50% delle osservazioni effettuate meno del 4,63% del tessuto era coinvolto e nel 75% dei casi, il danno era inferiore al 6,15%.

Fig. 3: Distribuzione della perdita economica media di ciascuna partita
Fig. 3: Distribution of the average economic loss for each batch

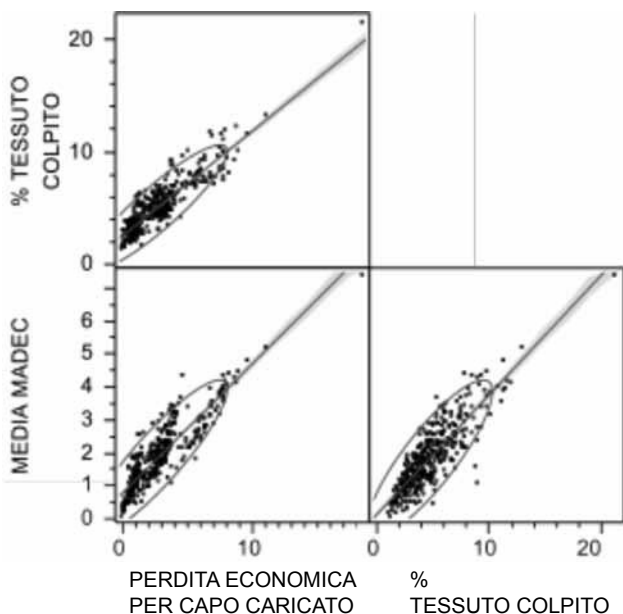


Il dato relativo alla perdita economica mostra un valore medio di €. 2,94 per suino caricato (min. €. 0,1 e max. €. 18,73). Nel 50% delle osservazioni effettuate la perdita economica per capo caricato è inferiore a €. 2,67; nel 75% dei casi è inferiore a €. 3,79. Per questo valore è inoltre maggiore il grado di dispersione dei caratteri osservati, come mostrato dai plot outliner in Figura 3.

Correlazioni

I valori osservati sono stati incrociati utilizzando uno Scatterplot Matrix per poter vedere, con un colpo d'occhio, le principali caratteristiche delle correlazioni esistenti tra i tre parametri considerati.

Fig. 4: Scatterplox Matrix mostrante le correlazioni esistenti tra le variabili analizzate
Fig. 4: Scatterplox Matrix showing the correlations between the analyzed variables



A coppie è stata poi effettuata l'analisi bivariata della regressione lineare semplice. Non possono essere date regole fisse per l'interpretazione del coefficiente di correlazione, che dipende da una serie di considerazioni. Possiamo dire che in genere, nel settore biomedico ed in epidemiologia, vengono considerati "buoni" valori attorno a 0.7 (nel caso di una correlazione positiva) oppure a -0.7 (per una correlazione negativa). (Bottarelli E., 2014) E' stata evidenziata una correlazione positiva (Rsquare 0,73) e statisticamente significativa (Pvalue<0,001) tra la percentuale di tessuto polmonare presentante lesioni riferibili a *M.hypopneumoniae* ed il valore del punteggio Madec assegnato durante lo score. Analogamente esiste una forte correlazione positiva statisticamente significativa (Pvalue<0,001) tra la percentuale di tessuto polmonare con lesioni e la perdita economica per suino caricato derivante da tale danno tissutale (Rsquare 0,81). Anche la correlazione esistente tra la perdita economica media per suino caricato in relazione al punteggio Madec assegnato è forte (Rsquare 0,79), positiva e statisticamente significativa (pValue<0,001).

Confronto tra i due periodi osservati

Il presente studio è stato condotto nel periodo compreso tra Marzo e Dicembre 2014, interessante perciò è stato valutare, oltre a tutto il periodo di controllo, 2 trimestri diversi, per analizzare se i ristalli nei mesi estivi differivano in modo statisticamente significativo dai ristalli effettuati nei mesi invernali e questo al fine di valutare l'incidenza della stagionalità rispetto al punteggio Madec, alla percentuale di tessuto colpito ed alla perdita economica.

E' evidente che, essendo il ciclo di ingrasso di circa 6 mesi, parte dell'accrescimento di un suino viene fatto comunque in periodi freddi e quindi eventuali infezioni tardive

potrebbero essere comunque responsabili di danni zootecnici ed economici non correttamente valutati in queste statistiche.

Lo scopo della nostra analisi si è quindi limitato a valutare differenze fra suini ristallati in mesi caldi, rispetto ad animali ristallati in mesi più freddi.

Le 413 partite prese in considerazione sono state quindi suddivise a seconda del periodo in cui è avvenuta la macellazione; ne è risultato che tra Maggio e Luglio sono state punteggiate 127 partite (31% delle osservazioni effettuate) e da Ottobre a Dicembre 150 partite (36%). Per ognuna delle tre variabili osservate è stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA), un insieme di tecniche statistiche facenti parte della statistica inferenziale che permettono di confrontare due gruppi di dati confrontando la variabilità interna a questi gruppi con la variabilità tra i gruppi.

Fig. 4 Distribuzione dei valori medi di perdita economica in suini ristallati nel periodo Novembre/Gennaio

Fig. 4 Distributions of average values of economic loss in swine housed in November/January

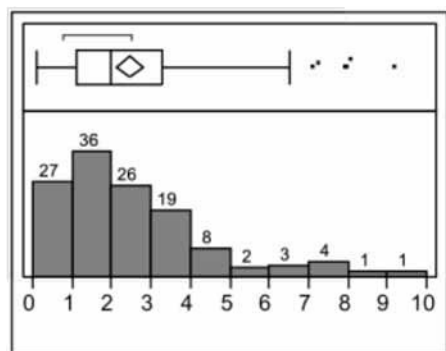
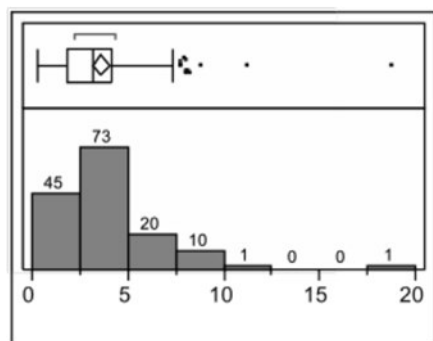


Fig. 5 Distribuzione dei valori medi di perdita economica in suini ristallati nel periodo Aprile/Giugno

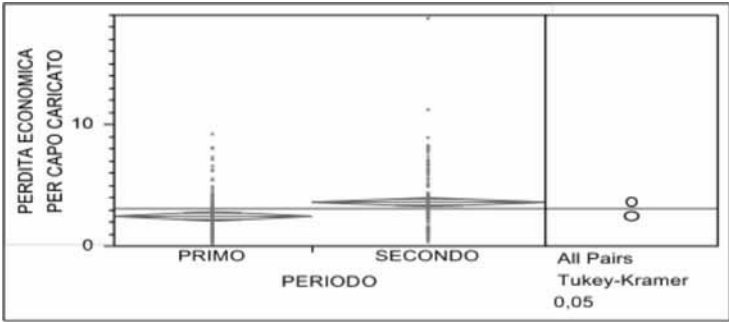
Fig. 5 Distributions of average values of economic loss in swine housed in April/June



Nelle figure 4 e 5 sono rappresentate le distribuzioni dei valori relativi alle perdite economiche per suini accasati nei periodi estivo ed invernale.

Fig. 6 Differenza tra la perdita economica rilevata nei suini accasati in Novembre/Gennaio (PRIMO PERIODO) e Aprile/Giugno (SECONDO PERIODO)

Fig. 6: *Economic loss difference between swine housed in November/January and April/June*



Già nelle figure 4 e 5 è possibile notare la differenza esistente tra la distribuzione dei dati ed il valore medio della perdita economica calcolata nel periodo di accasamento invernale (€ 2,46 con min. € 0,1 e max. € 9,18) e nel periodo estivo (€ 3,6 con min. € 0,32 e max € 18,73). L’analisi dei dati raccolti ha evidenziato come la perdita economica calcolata nel periodo estivo sia maggiore rispetto a quella rinvenuta nella stagione più fredda con differenza statisticamente significativa tra i due periodi (pValue<0,001).

Fig. 7 Distribuzione delle % di tessuto colpito in suini ristallati nel periodo Novembre/Gennaio

Fig. 7 *Distributions of % of affected tissue in swine housed in November/January*

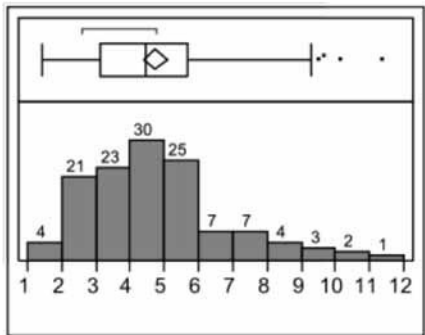


Fig. 8 Distribuzione delle % di tessuto colpito in suini ristallati nel periodo Aprile/Giugno

Fig. 8 *Distributions of % of affected tissue in swine housed in April/June*

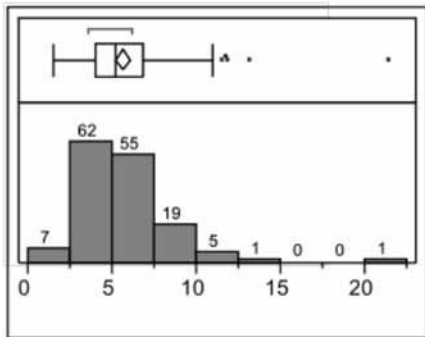
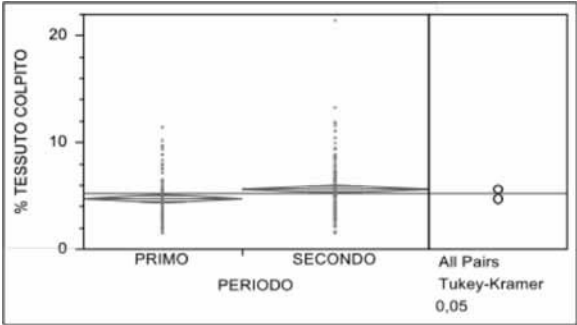


Fig. 9 Differenza tra la % di tessuto colpito rilevata nei suini accasati in Novembre/Gennaio (PRIMO PERIODO) e Aprile/Giugno (SECONDO PERIODO)

Fig. 9: Difference between % of affected tissue in swine housed in November/January and April/June



Analogamente, come mostrato nelle figure 7 e 8, è evidente una differenza, che si conferma poi essere statisticamente significativa ($p\text{Value}<0,005$) tra le percentuali di tessuto polmonare colpito in suini macellati nei due diversi periodi osservati.

Le lesioni polmonari sono maggiormente estese nei suini accasati in estate (valore medio 5,63% con min. 1,48% e max 21,44%) rispetto a quelli entranti nell'unità ingrasso nella stagione invernale (valore medio 4,73% con min. 1,43% e max. 11,38

Fig. 10 Distribuzione della media Madec in suini ristallati nel periodo Novembre/Gennaio

Fig. 10 Distributions of Madec Score in swine housed in November/January

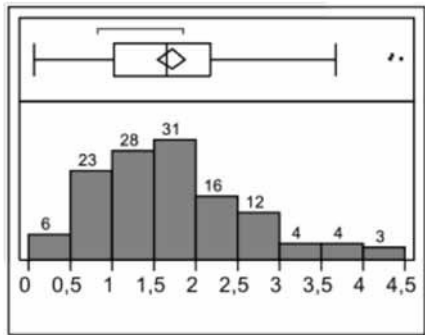


Fig. 11 Distribuzione della media Madec in suini ristallati nel periodo Aprile/Giugno

Fig. 11 Distributions of Madec Score in swine housed in April/June

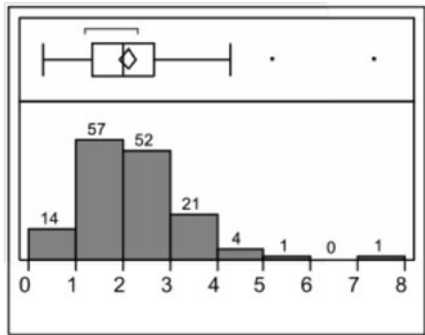
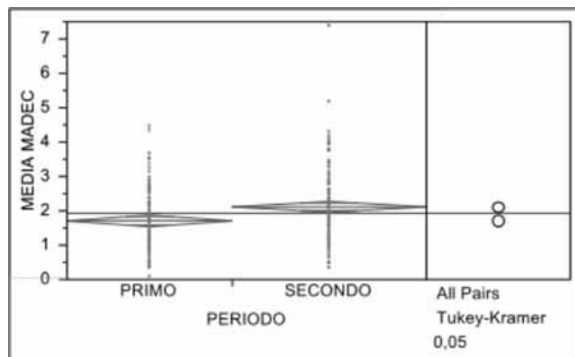


Fig. 12 Differenza tra la media Madec ottenuta in suini accasati in Novembre/Gennaio (PRIMO PERIODO) e Aprile/Giugno (SECONDO PERIODO)

Fig. 12: Difference between Madec Score in swine housed in November/January and April/June



Come mostrato nelle figure 10, 11 e 12, anche tra la media Madec ottenuta con accasamenti estivi (valore medio 2,11 con min. 0,32 e max 7,36) e quella ottenuta con accasamenti invernali (valore medio 1,71 con min. 0,07 e max. 4,45). esistono differenze statisticamente significative (pValue 0,005)

RISULTATI GENERALI

Come visto nei risultati è importante notare come la correlazione fra punteggio Madec, percentuale di tessuto colpito e perdita economica, sia statisticamente significativa.

La valutazione di tutte le partite analizzate, ha permesso di osservare come il punteggio Madec possa variare da un minimo di 0,07 ad un Massimo di 7,36 , la percentuale di tessuto polmonare colpito varia invece da 1,33 a 21,44 ed allo stesso modo la perdita economica oscilla fra perdite di 0,1 euro e 18,73 euro per capo.

Nella tabella 3 , sono indicati i valori minimi e massimi per ogni parametro valutato,e le medie di tutte le partite controllate nel periodo marzo-dicembre 2014.

Tab.3: valori minimi e massimi e medie dei parametri considerati

Tab.3: Maximum, minimum and average values of considered parameters

	PERDITA PER CAPO	TESSUTO COLPITO(%)	MEDIA MADEC
VALORE MINIMO	0,1	1,33	0,07
VALORE MASSIMO	18,73	21,44	7,36
MEDIE PERIODO	2,94	5,02	1,84

Anche l'analisi dei diversi parametri nei vari mesi dell'anno, ha dimostrato come le differenze fra i valori siano statisticamente significative, in base al periodo di ristallo e di macellazione. Il dato rilevante, è stato osservare come gli animali più colpiti da lesioni riferibili a *Mycoplasma hyopneumoniae*, siano quelli messi all'ingrasso nei mesi estivi (aprile, maggio e giugno) e macellati nell'ultimo trimestre dell'anno. Il risultato, potrebbe a nostro parere essere giustificato dal fatto che gli animali ristallati nel trimestre estivo, vengono macellati in inverno, quando le lesioni polmonari sono recenti e maggiormente visibili, a causa anche

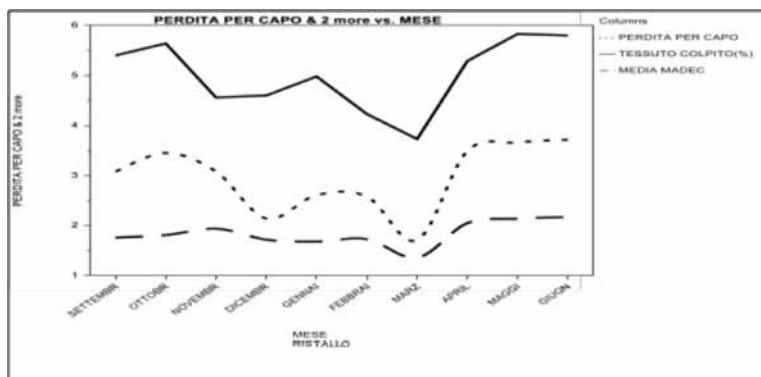
di una possibile ricircolazione di Mycoplasma nella fase finale di ingrasso. Al contrario negli animali ristallati in inverno e macellati in estate è plausibile pensare che la lesione tenda a regredire nel periodo estivo, esitando al massimo in cicatrici.

Nella tabella 4 e nel grafico successivo, sono riportati i risultati relativi ai parametri considerati, divisi per mese di macellazione e per mese di ristallo.

Tab. 4: media dei valori dei parametri considerati, in base al mese di macellazione e di ristallo

Tab. 4: average values of considered parameters based on housed and slaughtered period

MESE MACELLAZIONE	PERDITA PER CAPO	TESSUTO COLPITO(%)	MEDIA MADEC	MESE RISTALLO
MARZO	3.08	5.40	1.76	SETTEMBRE
APRILE	3.45	5.64	1.81	OTTOBRE
MAGGIO	3.08	4.56	1.94	NOVEMBRE
GIUGNO	2.14	4.60	1.72	DICEMBRE
LUGLIO	2.61	4.98	1.68	GENNAIO
AGOSTO	2.58	4.23	1.73	FEBBRAIO
SETTEMBRE	1.71	3.73	1.36	MARZO
OTTOBRE	3.49	5.29	2.05	APRILE
NOVEMBRE	3.66	5.83	2.14	MAGGIO
DICEMBRE	3.72	5.80	2.17	GIUGNO



L'ultimo aspetto considerato, prende in esame il rapporto fra diverse categorie di punteggio Madec e la perdita economica per suino macellato. Le 413 partite di suini valutati, sono state suddivise in diverse classi in base al punteggio Madec, e per ogni classe è stata correlata una perdita economica per capo, divisa per minimo e massimo valore. Come già in precedenza detto, ad un punteggio Madec, possono corrispondere diverse percentuali di polmone colpito a seconda che la lesione interessi un lobo accessorio o diaframmatico; è proprio per questo che, ad uguali punteggi, possono corrispondere percentuali di tessuto colpito e conseguentemente danni economici anche molto diversi. Come visto però nell'analisi statistica, la significatività della correlazione riferita a tutte le partite analizzate, è molto alta. Anche provando ad

escludere il 20% di valori collocati agli estremi della gaussiana (tab 4), la differenza fra i valori è comunque molto alta, e questo ci impedisce di creare una correlazione facilmente fruibile e leggibile, fra score polmonare e perdita economica.

Nella tabella 5 sono evidenziate le perdite economiche per capo macellato, in base alla classe di appartenenza del punteggio Madec.

Tab. 5: correlazione fra punteggio Madec e perdita economica per suino macellato

Tab. 5: correlation between Madec Score and economic loss based on slaughtered swine

MEDIA MADEC	TESSUTO COLPITO %	PERDITA ECONOMICA (minimo e massimo)	PERDITA ECONOMICA (80% dei valori)
0,00-0,5	1,69-9,13	1,06-5,91	1,2-5,84
0,51-1,00	1,90-12,18	0,44-9,79	1,06-7,24
1,01-1,50	1,43-10,13	0,10-7,94	0,27-4,15
1,51-2,00	1,33-10,36	0,20-8,46	0,61-4,7
2,01-2,50	1,48-21,44	0,32-18,73	1,07-4,94
2,51-3,00	3,02-11,53	0,90-8,03	0,96-6,48
3,01-3,50	3,13-11,87	1,21-8,08	2,26-7,38
3,51-4,00	2,70-9,37	0,79-8,82	1,26-8,25
4,01-4,50	3,18-7,84	0,94-7,08	1,02-5,52
4,51->5,00	5,39-8,07	3,09-9,18	N.S.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il grande numero di animali considerati e la significatività statistica dei dati analizzati, hanno permesso di evidenziare come i tre parametri analizzati possono essere incrociati fra loro , permettendo di elaborare conclusioni significative. Da un punto di vista statistico la correlazione fra punteggio Madec, percentuale di tessuto colpito e perdita economica, è assolutamente significativa per l'analisi del dato globale. E' altrettanto significativa se si analizzano diversi periodi dell'anno in funzione del mese di ristallo e di macellazione. Interessante notare come i suini ristallati nei mesi estivi, presentano score Madec e perdite economiche superiori, rispetto ad animali ristallati nei mesi più freddi.

La media madec delle 413 partite , nei 10 mesi considerati, è stata di 1,84 mentre la percentuale di tessuto polmonare colpito è stata di 5,02 e la perdita economica media per capo macellato di 2,94 euro.

Difficile invece, creare una tabella standardizzata e facilmente interpretabile, in grado di correlare il punteggio Madec e la perdita economica.

Nonostante il calcolo del tessuto colpito e della perdita economica sia fatto riferendosi a numerosissimi dati presenti in bibliografia e studiati per il suino leggero, è plausibile pensare che i dati complessivi raggiunti siano, anche se pur sempre frutto di una stima, utili a considerare la Polmonite Enzootica come una patologia fortemente penalizzante da un punto di vista economico e zootecnico.

BIBLIOGRAFIA

Bottarelli E. (2013), Quaderni di epidemiologia veterinaria.

<http://www.quadernodiepidemiologia.it>, cap.6, unità 11.

Dottori M. e coll.(2007) “Valutazione comparativa delle risultanze di scoring polmonare al macello tra differenti pesi di macellazione (100-160 kg)”. Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini XXXIII meeting annuale pp131-139

Gusmara C., Sala V., Gozzini M.,(2003) “Come valutare la diffusione dei patogeni nei cicli di ingrasso?” Summa 20, 223-228.

Kobish M. (1987) “Les Mycoplasmoses respiratoires di porc”. Rec. Méd. Vet 163, 419-430

Madec F., Kobish M., (1982) “Bilan lésionnel des porcs charcutiers à l’abattoir”. Journées de la Recherche Porcine en France 14, 405-412

Maes D., Haesebrouck F., (2013). “Infezioni da Mycoplasma hyopneumoniae”, pp: 517-528. In: Le patologie del maiale. 1st edizione by Paolo Martelli, Point Veterinaire Italie.

Ross R. F., (1999). “Mycoplasma disease”, pp. 495-509. In: Disease of swine 8th edition ed by Straw B. E., D’Allaire S., Mengeling W. L., Taylor D. J. Ames, Iowa state university press.

Salvini F., (2014). “E’ possibile quantificare il costo delle malattie nell’allevamento suino?”, Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini XL meeting annuale, pp 39-43

Straw B. E., Touvinen V. K., Bigras-Poulin M., (1989). “Estimation of the cost of pneumonia in swine herds in food animal economics”. J. Am. Vet. Med. Assoc. 195, 1702-1706

INCIDENZA DELL'ASCARIDIOSI SUINA SUI COSTI DI ALIMENTAZIONE E SULLA PLV (PRODUZIONE LORDA VENDIBILE) AZIENDALE: DATI PRELIMINARI

ECONOMIC IMPACT OF ASCARIS SUUM ON SLAUGHTER EFFICIENCY IN FATTENING PIGS: PRELIMINARY DATA

MERLINO V.¹, MASSAGLIA S.¹, VERDUNA T.¹, BORRA D.¹, RAMBOZZI L.²

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Forestali e Alimentari, Università degli Studi di Torino;

²Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Parole chiave: *Ascaris suum*, epatite parassitaria, valutazione dei costi

Key words: *Ascaris suum*, hepatic milk spots, economic evaluation

Riassunto

Le perdite economiche dovute all'infezione da parte di *Ascaris suum* nei suini all'ingrasso (sequestro dei fegati parassitati, maggiore indice di conversione alimentare e costi dei trattamenti antelmintici) sono state valutate principalmente in esperimenti controllati. Tuttavia, la stima dell'impatto economico causato dalla presenza di *A.suum* sulle performance dei suini non è di facile realizzazione nelle infestazioni naturali. Lo studio ha avuto come obiettivo quello di confrontare l'impatto economico alla macellazione di suini conferiti da aziende caratterizzate da una bassa o alta prevalenza di ascaridiosi. Sono state selezionate 12 aziende in base alla prevalenza di *A.suum* calcolata in funzione del numero di sequestri ispettivi per epatite parassitaria dal 2011 al 2014. La ricerca è stata condotta su 145.915 capi, macellati con un peso medio di 160 kg $\pm$ 10 %, valutando la qualità della carcassa secondo la classificazione EUROP e il rapporto massa magra/grassa delle cosce. Per ogni anno è stato calcolato l'impatto economico del costo della razione (CR) per ciascuna azienda e la PLV aziendale anche in base al valore delle carcasse e delle cosce declassate. Dai risultati emerge come il differenziale dei CR, tra aziende con alta e bassa prevalenza, è maggiore nelle aziende a ciclo aperto con un +22% dei costi, contro un +7% nelle aziende a ciclo chiuso; il differenziale medio della PLV risulta di +13,06% nelle aziende a ciclo chiuso e di +12,22% in quelle a ciclo aperto.

Abstract

Economic losses due to *A. suum* infection in fattening pigs (livers condemnation, daily gain decreasing, feed conversion efficiency, anthelmintic treatment cost) have mainly been documented in controlled experiments. Moreover, meat obtained from infected pigs was of a worse class as compared to uninfected fatteners, which influenced a decrease in pigs breeding profitability. However, estimating the economic impact due to *A.suum* on pig performance is not an easy target in commercial pig farms under natural exposure conditions. The aim of the study was to compare the economic impact on slaughter efficiency in fattening pigs belonging from farms with a history of low or high prevalence for *A. suum* infections. For this research twelve farms were selected; prevalence for each farm was calculated on *A. suum*-induced liver white spot at slaughtering, from 2011 to 2014. During this period 145.915 fatteners were slaughtered with an average weight equal to 160 kg $\pm$ 10 %; post-slaughter assessment was conducted according to EUROP

Pigs Carcass Classification and percentage of leg meat mass on fat mass was determined. Economic impact was evaluated considering feed ration cost for each farm/each year and the carcasses and legs rejected according to PDO Ham (Protected Designation of Origin) specifications. Results show that the differential cost between farms with a low or high prevalence for *A. suum* is very marked in the open cycle farms with a +22% of costs, while a +7 % in closed production cycle farms was found. In case of mean GSP differential, this is marked both in closed (+13,06%) and in open cycle farms (+12,22%).

INTRODUZIONE

Ascaris suum è uno dei più diffusi parassiti del suino e rappresenta ancora oggi un fattore limitante per la redditività aziendale causando un minor accrescimento dell'animale con conseguenze sulla qualità delle carcasse al macello. La crescita rallentata dei suini può indurre l'allevatore a concentrare la razione per favorire l'aumento di peso dell'animale che avviene in un periodo di tempo ristretto. Tale aspetto causa un peggioramento della quantità/qualità del grasso di copertura delle cosce, nonché la riduzione della percentuale di muscolo rispetto al grasso (Knecht et al., 2012) ed un potenziale declassamento delle cosce, escluse dal circuito dei Prosciutti crudi DOP. Gli effetti indiretti di *A. suum* in allevamento sono correlati alle caratteristiche del ciclo del parassita le cui forme larvali colpiscono, tra gli altri organi, i polmoni predisponendo l'animale a patologie polmonari più gravi causate da altri patogeni come *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Smith et al., 2011; Steenhard et al., 2009; Tjornehoj et al., 1992). A livello enterico il parassita adulto crea un "effetto ingombro", nonché l'atrofia dei villi della mucosa intestinale; questi effetti si ripercuotono sulla riduzione dell'alimento ingerito, sull'incremento del peso giornaliero e sull'Indice di Conversione Alimentare, quindi su un minor peso finale alla macellazione e sull'allungamento del ciclo di produzione con inevitabile aumento dei costi di mantenimento (Kipper et al., 2011; Roepstorff et al., 2011). E' noto come la sopravvivenza di *A. suum*, in particolare delle uova, sia fortemente condizionata da una corretta gestione igienico sanitaria aziendale (Nilsson, 1982; Roepstorff e Jorsal, 1990); nonostante le imponenti trasformazioni del settore (sale parto, gabbie di svezzamento, acciaio inossidabile, climatizzazione, idropulitrici, disponibilità di efficaci principi attivi antielmintici), la prevalenza di *A. suum* resta sostanzialmente invariata a livello mondiale (Vlaminck, 2013). L'obiettivo di questo studio preliminare è quello di fornire indicazioni sull'incidenza dell'ascaridiosi su ricavi, costi variabili annuali e performances alla macellazione in aziende suinicole piemontesi.

MATERIALI E METODI

Scelta delle aziende

L'indagine è stata condotta presso lo stabilimento di macellazione "Aimaretti spa", situato a Villafranca Piemonte (TO). La capacità produttiva dello stabilimento è di circa 220.000 capi (circa 800 tonnellate) all'anno, più del 30% dei capi macellati in Piemonte. Dall'integrazione di dati precedentemente raccolti nello stesso stabilimento di macellazione (Rambozzi et al., 2006; Rambozzi et al., 2014), sono state identificate tutte le aziende che hanno conferito allo stabilimento di macellazione un numero maggiore di 2000 capi negli Anni 2005-2006-2007-2011-2012-2013-2014.

Per ogni azienda è stata registrata la consistenza numerica aziendale, il numero e la consistenza numerica di ogni lotto portato a macellazione ed il numero di sequestri ispettivi per epatite parassitaria per ogni lotto (Banca Dati Regionale - Infomacelli). In

relazione al numero di sequestri ispettivi per epatite parassitaria tutti gli allevamenti sono stati suddivisi in quattro classi di positività, utilizzando come riferimenti la mediana, il I° ed il III° quartile. Ai fini dello studio, per l'analisi dei costi, sono state selezionate dodici aziende, caratterizzate da prevalenze costanti per ascaridiosi negli anni, di cui sei appartenenti al I° quartile (<20% di fegati sequestrati) e sei al IV° quartile (>82% di fegati sequestrati). Ogni azienda è stata identificata da un codice indicante la tipologia produttiva (CC: Ciclo Chiuso; CA: Ciclo Aperto), la classe di positività (I°: primo quartile, bassa prevalenza; IV°: quarto quartile, alta prevalenza) ed il numero medio di capi macellati annualmente (P: 2000-3000 capi; M: 3000-5000 capi; G: >5000 capi).

Costi variabili e PLV

Per la valutazione economica sulla redditività delle aziende sono stati confrontati ricavi ed i costi variabili annuali di ogni allevamento quadriennio negli Anni 2011-2012-2013-2014. I ricavi delle aziende selezionate sono stati stimati, sulla base del numero di capi conferiti alla macellazione, e sul numero annuo di animali declassati e di cosce scartate, in base ai requisiti stabiliti dal Disciplinare del circuito del Prosciutto DOP (http://www.prosciuttodiparma.com/it_IT/consorzio/disciplinare-produttivo), con particolare riferimento al peso minimo degli animali alla macellazione (160 kg±10 % della categoria “suino pesante” - classificazione EUROP) e al peso minimo di 12 kg delle cosce con rapporto massa grassa/magra del 51%. La scelta di valutare l'incidenza solo di alcuni costi variabili annuali, quali i costi di alimentazione, è stata fatta perché sono quelli che vanno ad incidere maggiormente – in un'analisi a breve termine - sul margine di profitto aziendale. I costi fissi (quote di ammortamento dei fabbricati e dei macchinari, manodopera, imposte ed affitti) ed alcuni costi annuali variabili (profilassi/terapia antiparassitaria), inoltre, non sono stati considerati anche a causa del ridotto numero delle aziende e della marcata eterogeneità nella gestione. Per calcolare il costo di razionamento giornaliero (€/capo/giorno), sono stati utilizzati i prezzi delle singole materie prime, rilevati dai listini della CCIAA di Forlì-Cesena, Modena e Lodi (Anni 2011, 2012, 2013, 2014). Tale costo è stato elaborato per ogni fase del ciclo produttivo (svezzamento, accrescimento, magronaggio, ingrasso e finissaggio) in modo da ricavare il costo di razionamento totale per ogni azienda e per ogni anno considerato.

RISULTATI

Aziende

In Tabella 1 sono riportati i dati relativi alle 12 aziende selezionate. Nel quadriennio 2011-2014 sono stati analizzati 145.915 capi alla macellazione, di cui 68.180 provenienti da aziende a bassa prevalenza per ascaridi e 77.735 da aziende ad elevata prevalenza.

Tabella 1. Classificazione e numero di capi macellati per anno delle aziende selezionate
Table 1. Classification and number of slaughtered fattened pig for year in each selected farm

Tipologia*	Dimensione (n)	Capi macellati (n)				Totale
		2011	2012	2013	2014	
CC – IV°	P	3.584	2.775	3.595	152	10.106
CC – IV°	M	3.124	3.062	3.048	2.559	11.793
CC – IV°	G	6.437	4.868	8.486	6.769	26.560
CA – IV°	P	1.026	619	1.923	1.250	4.818
CA – IV°	M	1.986	2.344	1.458	1.904	7.692
CA – IV°	G	1.777	1.745	2.035	1.654	7.211
CC – I°	P	1.728	1.146	2.016	2.014	6.904
CC – I°	M	270	2.807	5.800	5.712	14.589
CC – I°	G	2.886	270	406	n.d.	3.562
CA – I°	P	135	135	280	272	822
CA – I°	M	6.396	4.906	5.902	6.402	23.606
CA – I°	G	8.258	6.165	7.539	6.290	28.252
		37.607	30.842	42.488	34.978	145.915

*CC: Ciclo Chiuso; CA: Ciclo aperto; I°: azienda appartenente al I° quartile; IV°: appartenente al IV° quartile.

**P: <3000 capi; M: 3000-5000 capi; G: >5000 capi

Costi di alimentazione

Dalla determinazione dei costi delle diverse materie prime impiegate per il razionamento dei suini nelle diverse fasi produttive è stato calcolato il costo di razionamento per singola realtà aziendale.

In Tabella 2 e in Tabella 3 è riportato il costo complessivo per ciclo e per fase di produzione sostenuto dagli allevamenti analizzati, rispettivamente per quelle a ciclo chiuso e a ciclo aperto.

Per quanto riguarda il differenziale di costo di razionamento tra aziende a bassa prevalenza e ad alta prevalenza per ascaridiosi, risulta per quest'ultime un valore medio di +7% (2011:7,3%; 2012:7,2%; 2013:7,9%; 2014: 6,5%), per le aziende a ciclo chiuso e di +22% (2011:27%; 2012:17%; 2013:19%; 2014:22%) per le aziende a ciclo aperto.

Tabella 2. Costo medio di razionamento, suddiviso per fasi del ciclo produttivo, sostenuto nel quadriennio 2011-2014 dalle 6 aziende a ciclo chiuso analizzate.

Table 2. Feed ration cost in each production phase (2011-2014)

FASE	CC -IV°*				CC -I°*			
	€/capo				€/capo			
	2011	2012	2013	2014	2011	2012	2013	2014
Svezamento	8,55	10,89	10,88	9,47	8,27	10,76	10,74	9,33
Accrescimento	8,35	10,77	10,71	9,24	8,01	10,57	10,52	9,07
Magronaggio	23,64	31,14	31,00	26,62	20,69	27,80	27,67	23,68
Ingrasso	35,70	51,71	52,33	43,87	35,08	49,88	50,09	42,23
Finissaggio	20,41	29,89	30,21	25,16	18,06	26,33	26,27	23,04
TOTALE	96,65	134,40	135,12	114,36	90,11	125,34	125,28	107,35

*CC: Ciclo Chiuso; I°: azienda appartenente al I° quartile; IV°: appartenente al IV° quartile.

Tabella 3. Costo medio di razionamento, suddiviso per fasi del ciclo produttivo, sostenuto nel quadriennio 2011-2014 dalle 6 aziende a ciclo aperto analizzate.

Table 3. Feed ration cost in each production phase (2011-2014)

FASE	CA -I°				CA -IV°			
	€/capo				€/capo			
	2011	2012	2013	2014	2011	2012	2013	2014
Svezamento	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Accrescimento	8,36	10,81	10,84	9,43	10,24	12,61	12,97	11,72
Magronaggio	22,27	29,12	29,45	25,35	25,97	31,88	32,78	29,61
Ingrasso	35,45	49,67	50,41	42,57	46,14	59,30	61,34	54,70
Finissaggio	20,24	28,59	29,03	24,37	27,20	34,93	36,13	32,23
TOTALE	86,32	118,20	119,73	101,72	109,55	138,72	143,22	128,25

*CA: Ciclo Aperto; I°: azienda appartenente al I° quartile; IV°: appartenente al IV° quartile.

PLV

In Tabella 4 sono riportati i valori di PLV e di declassamento di cosce e capi negli anni, la relativa incidenza sulla PLV complessiva, nonché il valore medio di declassamento nel quadriennio 2011/2014.

In media, calcolando i differenziali della PLV tra le aziende a ciclo chiuso, emerge che le aziende a bassa prevalenza guadagnano in media un +13,06%, considerando i quattro anni (2011:9,19%; 2012:10,22%; 2013:12,54%; 2014: 20,29%). Le aziende a bassa prevalenza nelle realtà a ciclo aperto hanno un guadagno poco inferiore rispetto alle aziende a ciclo chiuso con un differenziale di PLV medio del 12,22 % (2011:9,20%; 2012:9,19%; 2013:10,67%; 2014: 19,83%) nel quadriennio rispetto alle aziende ad alta prevalenza.

Tabella 4. *PLV, declassamento delle cosce e relativa incidenza negli anni 2011/2014***Table 4.** *GSP (Gross saleable production) and devaluation incidence % on total GSP from 2011 to 2014*

VALORI DELLA PLV E DEL DECLASSAMENTO PER OGNI AZIENDA									INCIDENZA DEL DECL. DI COSCE E DI ANIMALI SULLA PLV (%)				DECL. MEDIO 2011/2014 (%)
2011		2012		2013		2014		2011	2012	2013	2014		
AZIENDA*	PLV (€)	Valore di decl (€)	PLV (€)	Valore di decl.(€)	PLV (€)	Valore di decl.(€)	PLV (€)					Valore di decl. (€)	
CC – IV° -P	738.359	41.158	578.035	38.383	774.400	71.814	32.384	5.340	5,6	6,6	9,3	16,5	9,5
CC – IV°- M	664.103	47.205	660.967	50.787	674.831	62.099	554.804	67.303	7,1	7,7	9,2	12,1	9,0
CC – IV°- G	1.399.990	61.366	1.068.142	46.553	1.915.602	82.791	1.487.228	65.253	4,4	4,4	4,3	4,4	4,4
CA – IV°- P	217.479	12.100	132.754	7.715	423.717	27.388	270.003	27.477	5,6	5,8	6,5	10,2	7,0
CA – IV°-M	444.428	23.970	529.606	28.822	338.819	19.842	431.731	32.656	5,4	5,4	5,9	7,6	6,1
CA – IV°-G	367.148	25.475	361.118	22.532	436.895	33.223	352.470	58.482	6,9	6,2	7,6	16,6	9,3
CC – I°-P	365.197	14.525	244.352	9.663	442.390	18.196	434.357	7.553	4,0	4,0	4,1	1,7	3,4
CC – I°-M	58.488	180	613.601	1.873	1.310.989	10.121	1.257.175	11.095	0,3	0,3	0,8	0,9	0,6
CC – I°-G	615.897	3.332	57.832	-	90.062	563	ND	ND	0,5	0,0	0,6		0,4
CA – I°-P	28.645	324	28.799	219	61.474	468	57.893	252	1,1	0,8	0,8	0,4	0,8
CA – I°-M	1.352.335	10.545	1.047.793	9.179	1.297.304	11.380	1.365.867	9.165	0,8	0,9	0,9	0,7	0,8
CA – I°-G	1.848.107	13.788	1.392.216	10.294	1.752.189	12.973	1.422.309	10.932	0,7	0,7	0,7	0,8	0,7

*CC: Ciclo Chiuso; CA: Ciclo aperto;

I°: azienda appartenente al I° quartile; IV°: appartenente al IV° quartile; P: <3000 capi; M: 3000-5000 capi; G: >5000 capi.

DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo studio preliminare è stato quello di fornire indicazioni sull'incidenza dell'ascaridiosi suina sui ricavi, sui costi variabili annuali e sulle performances alla macellazione in aziende suinicole piemontesi.

Nel presente studio sono stati considerati, come costi variabili annuali, solo i costi di alimentazione, i quali vanno ad incidere maggiormente – in un'analisi a breve termine (quadriennio 2011-2014) - sul margine di profitto aziendale. Altri costi annuali variabili legati all'ascaridiosi, quali ad esempio eventuali profilassi o terapie antiparassitarie, non sono stati considerati a causa del ridotto numero delle aziende analizzate e della marcata eterogeneità nella gestione.

Lo studio ha quindi permesso, in primo luogo, di valutare le differenze in termini di costi di alimentazione sostenuti da aziende suinicole intensive caratterizzate da una bassa o da una alta prevalenza di *A. suum*. A tal proposito, analizzando il differenziale di costi, le differenze tra aziende a bassa ed alta prevalenza per ascaridiosi sono evidenti tra le due tipologie di ciclo produttivo considerate; infatti, è risultato che le aziende a ciclo chiuso sostengano un +7% di costi rispetto ad un +22% nelle aziende a ciclo aperto con una differenza di circa 23 €/capo tra la tipologia a bassa prevalenza a ciclo chiuso e quella ad alta prevalenza a ciclo aperto. Quindi, mediamente, un'azienda appartenente alla seconda categoria, spende circa 23 € in più per capo allevato ad ogni ciclo produttivo. Ciò si traduce in un costo di alimentazione negli allevamenti ad alta prevalenza di 130 €/capo/ciclo (ciclo chiuso) e di 139 €/capo/ciclo (ciclo aperto). Per tutte le aziende, la fase di allevamento con minore incidenza sui costi è quella dell'accrescimento, mentre quella più onerosa è, come ci si aspettava, la fase di ingrasso.

In secondo luogo, è stata valutata la PLV aziendale. In questi termini il differenziale tra le aziende ad alta e bassa prevalenza, è marcato. Tuttavia non vi è uno scarto importante tra le due tipologie di ciclo produttivo (Δ medio =13,06%, ciclo chiuso; Δ medio =12,22%, ciclo aperto). Analizzando le singole realtà aziendali, la PLV complessiva, le aziende ad alta prevalenza per ascaridi, nel quadriennio oscillavano fra il 3,4 ed il 9,5% di declassamento medio, mentre quelle a bassa prevalenza fra lo 0,4 e lo 0,8%. È evidente come le aziende a bassa prevalenza non abbiano capi declassati per il non raggiungimento del peso minimo di macellazione ma solo cosce, con valori compresi fra 0% per CC-I° (nessun declassamento) e 4,2 per CA-I°. Le aziende con alte prevalenze per ascaridi raggiungono percentuali elevate di declassamento che coinvolgono sia le cosce, sia i capi. Gli allevamenti con sequestri per epatite parassitaria superiori al 50% presentano dei livelli di declassamento delle cosce compresi fra il 4,9% ed il 18,2%; valori simili si registrano per i capi macellati (dal 3,3% al 13,6%). L'ascaridiosi risulta quindi un fattore importante sui costi di alimentazione incrementandola in maniera importante soprattutto nelle realtà a ciclo aperto. Anche per quel che concerne la PLV basse prevalenze da ascaridi incidono positivamente, incrementandola in media del 13%.

BIBLIOGRAFIA

Kipper M., Andretta I., Monteiro S.G., Lovatto P.A., Lehnen C.R. (2011). Meta-analysis of the effects of endoparasites on pig performance. *Veterinary Parasitology* 181, 316-320.

Knecht D., Popiolek M., Zalesny G. (2012). Does meatiness of pigs depend on the level of gastro-intestinal parasites infection?. *Preventive Veterinary Medicine* 99, 234–239.

Nilsson O. (1982). Ascariasis in the pig. An epizootiological and clinical study. *Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum* 79, 1-108.

Rambozzi L., Panero G., Martano G. (2006). Prevalenza di *Ascarissuum*: rilievi ispettivi e indagine epidemiologica. La Settimana Veterinaria 513, 89-93

Rambozzi L., Massaglia S., Merlino V., Borra D., Boschetti G. (2014). Evaluation of the influence of risk factors related to farm management and structure on Ascariasis prevalence: the Piedmontese context. XL Italian Society for Swine Pathology and Breeding (SIPAS) Meeting, 27-28 March, Montichiari (BS), Italy, 99-105.

Roepstorff A., Mejer H., Nejsun P., Thamsborg S.M. (2011). Helminth parasites in pigs: New challenges in pig production and current research highlights. Veterinary Parasitology 180 (1-2), 72-81.

Roepstorff A., Jorsal S.E. (1990). Relationship of the Prevalence of Swine Helminths to Management-Practices and Anthelmintic Treatment in Danish Sow Herds. Veterinary Parasitology 36, 245-257.

Smith R.P., Sanchez-Vazquez M.J., Cook A.J., Edwards S.A. (2011). Abattoir-based study investigating the association between gross pathological lesions and serological tests for *Salmonella* infection in pigs. Veterinary Record 168, 240.

Steenhard N.R., Jungersen G., Kokotovic B., Beshah E., Dawson H.D., Urban J.F. Jr., Roepstorff A., Thamsborg S.M. (2009). *Ascarissuum* infection negatively affects the response to a *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccination and subsequent challenge infection in pigs. Vaccine 27, 5161-5169.

Tjornehoj K., Eriksen L., Aalbaek B., Nansen P. (1992). Interaction between *Ascarissuum* and *Pasteurella multocida* in the lungs of mice. Parasitology Research 78, 525-528.

Vlaminck J. (2013). Evaluation of *Ascarissuum* haemoglobin as a vaccine and diagnostic antigen. Ed Salisbury laan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium.

<http://www.fc.camcom.it/>

<http://www.mo.camcom.it/>

<http://www.lo.camcom.gov.it/>

http://www.prosciuttodiparma.com/it_IT/consorzio/disciplinare-produttivo

PREVALENZA DI ROGNA SARCOPTICA IN PARTITE DI SUINI MACELLATI

PREVALENCE OF SARCOPTIC MANGE IN SWINE AT SLAUGHTERHOUSE

MAIOLI G.¹, SCOLLO A.², LEOTTI G.³, DEFILIPPO F.¹, VELOCİ M.²,
BONILAUDI P.¹, DOTTORI M.¹, LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER)

² Suivet, ³ Merial Italia spa, Milano

Parole chiave: Rogna sarcoptica, macello, suini

Key words: sarcoptic mange, slaughterhouse, swine

Abstract

In this study we evaluated the prevalence of *Sarcoptes scabiei* var. *suis* mite in pigs at slaughterhouse in northern Italy. From August 2014 to January 2015 we sampled 219 pigs batches at slaughterhouse belonging to 112 farms from 20 different provinces. We analysed pools from 30 swine ear scrapings with a clarification/concentration method. Sarcoptic mange overall prevalence in herds was 13,7% (IC 95%: 9,1%-18,3%), while positive farms were 19,6% (IC 95%: 12,2%-27%) of 112 farm sampled.

Sarcoptic mange is still present in swine industry in northern Italy representing an important cause of economic losses in pig breeding and a problem for difficult diagnosis and managing.

Riassunto

In questo studio è stata valutata la prevalenza di *Sarcoptes scabiei* var. *suis* in partite di suini macellati provenienti da allevamenti del nord Italia. Nel periodo agosto 2014 – gennaio 2015 sono state campionate 219 partite di suini macellati, provenienti da 112 allevamenti di 20 province suddivise su 6 regioni diverse (Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, Piemonte, Marche e Friuli-Venezia Giulia). Sono stati analizzati pool costituiti da 30 scarificati auricolari di suino attraverso una metodica di chiarificazione e concentrazione. La prevalenza totale in tutte le partite campionate è risultata del 13,7% (IC 95%: 9,1%-18,3%), mentre gli allevamenti positivi sono risultati essere il 19,6% (IC 95%: 12,2%-27%).

Questo lavoro evidenzia che la rogna sarcoptica nel suino è una problematica attuale ed importante nell'allevamento industriale, sia per le perdite economiche ad essa correlate sia per la difficile diagnosi ed eliminazione.

INTRODUZIONE

Sarcoptes scabiei var. *suis* è un acaro a diffusione cosmopolita; gli adulti di questa specie posseggono un corpo rotondo, ventralmente appiattito e convesso dorsalmente. Le femmine adulte sono lunghe da 0,3 a 0,6 mm e larghe da 0,25 a 0,4 mm, mentre i maschi sono più piccoli, lunghi 0,3 e larghi 0,1-0,2 mm. L'intero ciclo biologico ha luogo sull'ospite: l'accoppiamento avviene sulla superficie cutanea, poi la femmina scava una tortuosa galleria permanente per deporre le uova. Lo scavo procede alla velocità di 5 mm al giorno e la galleria può raggiungere i 2-3 cm. Le uova si schiudono in circa 3-4 giorni.

Il ciclo dura circa 17-21 giorni. (Taylor et al., 2010). Gli ospiti si contagiano per contatto con soggetti ammalati, si presume per trasferimento delle forme larvali che si trovano sulla superficie cutanea. La trasmissione si realizza tra individui adulti e tra scrofe e nidiata. Molti suini sono colpiti da forme sub-cliniche per tutta la loro vita, il momento di contagio più importante dal punto di vista epidemiologico sembra essere tra la scrofa ed i suinetti durante l'allattamento.

Nel suino le sede di elezione degli acari sono le orecchie da dove, successivamente si diffondono in altri distretti cutanei come dorso, fianchi ed addome.

Solitamente nell'allevamento si osservano due forme di rogna: una forma cronica o ipercheratosica, osservata soprattutto nelle scrofe e una forma allergica da ipersensibilità che colpisce i soggetti all'ingrasso.

I sintomi più comuni sono rappresentati da prurito, eritema papulare e perdita di pelo. Se l'infestazione progredisce la pelle si ispessisce e diviene crostosa con presenza di essudato, fino a casi più gravi i quali vanno incontro ad anoressia, perdita di peso, difficoltà uditive e cecità. Il grattamento provoca inoltre escoriazioni che favoriscono lo sviluppo di infezioni secondarie.

La rogna sarcoptica del suino è una delle più importanti cause di perdita economica nell'allevamento industriale. Stime di prevalenza sono state riportate in studi fatti in numerosi paesi e nei quali la positività per rogna sarcoptica varia dal 50 al 95% degli allevamenti (Cargill et al., 1997).

In uno studio di Galuppi et al. (2007) in cui sono state analizzate le orecchie di 380 animali provenienti da 12 allevamenti della Lombardia e dell'Emilia Romagna la prevalenza di scarificati auricolari positivi è risultata essere del 5,7% ma con un'alta percentuale di allevamenti infetti (50%).

Nel presente studio è stata valutata la prevalenza di *Sarcoptes scabiei* var. *suis* in partite di suini macellati provenienti da allevamenti Italiani.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo agosto 2014 – gennaio 2015 sono state campionate 219 partite di suini pesanti (9 mesi- circa 160 kg) macellati, provenienti da 112 allevamenti di 20 province suddivise su 6 regioni diverse (Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, Piemonte, Marche e Friuli-Venezia Giulia) (tabella 1). Dei 112 allevamenti campionati, 68 sono stati campionati solo una volta, 20 allevamenti sono stati campionati due volte, 10 allevamenti sono stati campionati 3 volte, 6 allevamenti sono stati campionati diverse volte nell'arco dell'anno (dalle 7 alle 10 volte).

Il campionamento è stato effettuato in catena di macellazione, scarificando il padiglione auricolare dei primi 30 suini della partita con bisturi o cucchiaino di Volkmann; il materiale è stato posto in contenitori rigidi sterili ed è stato conferito presso l'IZSLER per indagini di laboratorio.

Metodiche di laboratorio

I campioni sono stati analizzati con la metodica proposta dal dott. Martin Visser (Merial GmbH, Kathrinenhof Research Center, Walchenseestr. 8-12, 83101 Rohrdorf, Germany. martin.visser@merial.com) di chiarificazione e concentrazione. In breve il materiale proveniente dagli scarificati auricolari di 30 animali è stato posto in un becker, al quale è stata aggiunta una soluzione al 10% di Idrossido di Potassio (KOH), che ha azione cheratinolitica; il campione è stato tenuto in agitazione su piastra riscaldante a circa 70°

fino a completa chiarificazione (da 30 min a 3 h); il materiale è stato poi trasferito in una provetta e centrifugato a 1500 rpm per 5 min; dopo l'eliminazione del surnatante il sedimento è stato osservato allo stereomicroscopio.

Questa metodica fornisce risultati solo di tipo qualitativo (positivo/negativo), ma non fornisce dati sul grado d'infestazione del singolo animale.

RISULTATI

Nel periodo agosto 2014 – gennaio 2015, il monitoraggio eseguito al macello ha permesso di rilevare 30 partite positive per rogna sarcoptica su 219 partite di suini esaminati, con una prevalenza del 13,7% (IC 95%: 9,1%-18,3%). Sono risultati positivi per la presenza di *S. scabiei* 22 allevamenti su 112 campionati, con una prevalenza del 19,6% (IC 95%: 12,2%-27%) (tabella 1).

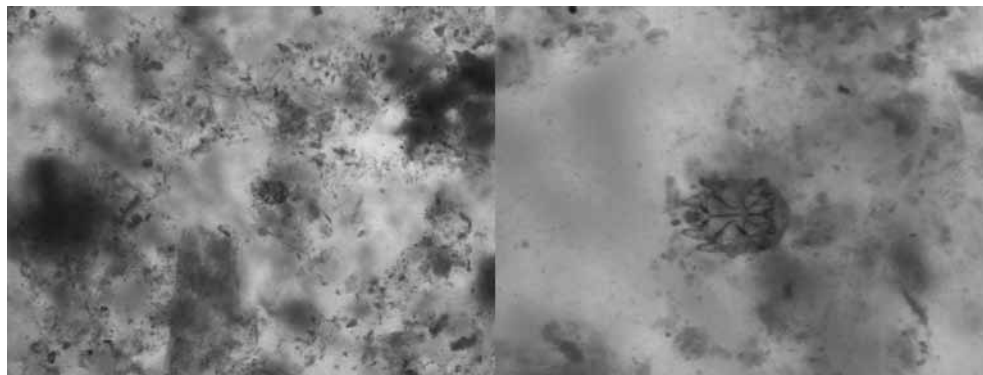
Tabella 1- Numero di allevamenti, partite campionate e partite positive esaminati per provincia
Table 1- Number of farms, herds and positive sample found in every province

Provincia	Allevamenti	Partite esaminate	Partite positive
Ascoli Piceno	1	1	0
Bergamo	2	2	0
Brescia	15	35	7
Cremona	23	35	0
Forlì- Cesena	4	13	1
Lodi	5	5	1
Milano	1	2	0
Mantova	25	57	10
Modena	8	12	0
Piacenza	1	1	0
Padova	1	4	1
Pordenone	2	3	1
Parma	3	8	5
Pavia	4	9	2
Ravenna	1	1	0
Reggio Emilia	7	16	1
Torino	2	4	0
Treviso	2	2	0
Venezia	3	5	1
Verona	2	4	0
Totale complessivo	112	219	30

Gli acari appartenenti alla specie *Sarcoptes scabiei* sono stati facilmente visualizzabili allo stereo microscopio (figura1).

Figura 1- esemplare di *Sarcoptes scabiei* (ingrandimento 10X e 40X)

Figure 1- *Sarcoptes scabiei* mite (10X and 40X magnification)



Negli allevamenti campionati più di una volta la positività per rogna sarcoptica non è mai stata costante, tranne che per un allevamento che è risultato positivo per tutte quattro le partite esaminate. Le partite di suini positive sono state riscontrate in tutti i mesi dell'anno, senza un andamento di tipo stagionale.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il primo punto che merita un breve approfondimento riguarda la metodica di laboratorio per la rilevazione degli acari della rogna.

Nella rogna sarcoptica l'unico metodo diagnostico che fornisce una diagnosi certa è l'osservazione degli acari negli scarificati cutanei. Questo metodo ha una specificità del 100% ma una sensibilità molto bassa, che si attesta intorno al 10% (>10% per magroni e ingrassi e <10% per animali adulti) a causa della profondità delle lesioni in cui si trovano gli acari (Yeoman, 1984); inoltre il numero di acari coinvolti è strettamente correlato alla forma clinica della malattia (acuta/cronica). Un metodo indiretto per diagnosticare la rogna si basa sulla valutazione delle lesioni papulari al macello (ADS: Average Dermatitis Score): attraverso la determinazione di un punteggio (da 0 a 3) che si riferisce alla gravità delle dermatiti papulari. Vari studi hanno dimostrato che per dermatiti localizzate la specificità delle lesioni è di circa il 75–80% mentre per dermatiti generalizzate (punteggio 2 e 3) è altamente specifico (>98%) (Cargill et al., 1997).

Un altro metodo diagnostico indiretto è basato sulla rilevazione nel siero o nel meat juice di animali macellati, di anticorpi anti *S. scabiei* tramite un test ELISA (Hollanders et al., 1997). Questo metodo presenta tuttavia alcuni limiti: in caso di infestazioni precoci l'animale risulta sieronegativo anche se infestato e in caso di trattamenti acaricidi gli animali rimangono sieropositivi per lungo tempo (circa 9 mesi) prima che il titolo cominci ad abbassarsi anche in assenza di acari (Bornstein et al., 1994). Inoltre il test ELISA ha un costo molto più elevato della metodica diretta. La metodica impiegata in questo studio si basa sulla visualizzazione diretta degli acari in scarificati auricolari di carcasse al macello e possiede numerosi vantaggi:

- il prelievo al macello può aumentare la sensibilità in quanto l'ingrasso è il settore produttivo maggiormente colpito da rogna sarcoptica ed è più probabile trovare animali infestati rispetto ad altri settori produttivi (magronaggio)

- gli acari possono essere rilevati anche in assenza di dermatite, quindi possono indicare un'infezione subclinica o una recente introduzione nell'allevamento
- si tratta di una metodica economica
- si possono esaminare pool di 30 animali

Esistono però anche alcuni svantaggi:

- la sensibilità è molto bassa, inferiore al 10% e comunque difficile da valutare rispetto ad altre metodiche
- questo metodo diagnostico non indica se l'infestazione è attiva o no in quanto il calore ed il KOH uccidono gli acari presenti. Infatti per individuare una infestazione attiva è necessario visualizzare gli acari vivi nel materiale patologico ed è stato dimostrato che adulti e stadi ninfali di *S. scabiei* possono permanere nel condotto uditivo anche 15 giorni dopo il trattamento acaricida, anche se morti (Dr. Visser, comunicazione personale).

Una riflessione va fatta anche per quello che riguarda il benessere animale e quindi indirettamente anche le performance produttive. La rogna sarcoptica è sicuramente una malattia sottostimata e raramente diagnosticata per la carenza di sensibilità dei test diagnostici precedentemente elencati. La facilità di trasmissione tra gli animali, sia per via diretta sia per via indiretta la rende inoltre una malattia di difficile eradicazione. Il riscontro di acari negli scarificati auricolari in assenza di dermatiti può indicare comunque un'infestazione cronica che può avere ripercussioni negative sia sul benessere sia sulle performance degli animali. Diversi studi riportano un calo dell'incremento ponderale che va dal 4 % fino al 12% (Cargill and Dobson, 1979; Martelli et al., 2013) e questo è direttamente proporzionale alla reazione di ipersensibilità agli acari. L'infestazione da luogo ad un intenso prurito e lesioni da grattamento che favoriscono lo sviluppo di infezioni secondarie. Altri danni economici correlati all'infestazione da *S. scabiei* comprendono lo scarto delle carcasse in sede di macellazione, danni diretti alle gabbie per il continuo grattamento, aumento della mortalità neonatale e diminuzione della produzione di latte nelle scrofe. Infine, l'infestazione da *S. scabiei* può avere un'azione di depressione nei confronti del sistema immunitario, con possibile compromissione della qualità della risposta immunitaria alle vaccinazioni (Taylor et al., 2010).

BIBLIOGRAFIA

Alonso de Vega, F., Mendez de Vigo, J., Ortiz Sanchez, J., Martinez-Carrasco Pleite, C., Albaladejo Serrano, A., Ruiz de Ybanez Carnero, M.R., 1998. Evaluation of the prevalence of sarcoptic mange in slaughtered fattening pigs in south-eastern Spain. *Vet. Parasitol.* 76, 209.

Bornstein S., Fellstrom C., Thebo P. and Wallgren P., 1994. Eradication of sarcoptic mange in a herd of pig monitored by skin scraping and ELISA. *Proceedings of the 13th Conference of the international Pig Veterinary Society, Bangkok, 26–30 June 1994*, 251.

Cargill, C.F., Pointon, A.M., Davies, P.R., Garcia, R., 1997. Using slaughter inspections to evaluate sarcoptic mange infestation of finishing swine. *Vet. Parasitol.* 70, 191–200.

Galuppi R, Avenoso AM, Leotti G, Ostanello F, Poglayen G, Tampieri MP., 2007. Diagnosis of sarcoptic mange in slaughtered swine. *Vet Res Commun.* 31.

Hollanders W., Vercruysse J., Raes S. and Bornstein S. 1997. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serological diagnosis of sarcoptic mange in swine. *Veterinary Parasitology*, 69, 117–123.

Martelli P (a cura di), 2013, Le patologie del maiale, Le Point Vétérinaire Italie, Milano
Smets K. and Vercruysse J., 2000. Evaluation of different methods for the diagnosis of scabies in swine. *Veterinary Parasitology*, 90, 137–145.

Suppl 1:233-6. PubMed PMID: 17682883. Cargill, C.F. and Dobson, K.J., 1979. Experimental *Sarcoptes scabiei* infestation in pigs: effects on production. *Vet. Rec.*, 104: 33-36.

Taylor Mike A.; Coop Robert L.; Wall Richard , *Parassitologia e malattie parassitarie degli animali*, 2010, Editore EMSI.

Yeoman, G.H., 1984. Pig mange: new concepts in control. In: F.W.G. Hill (Editor), *The Veterinary Annual*. 4th edn., Scientechnia, Bristol, pp. 132-137.

DIFFERENTI STRATEGIE DI ALIMENTAZIONE DI SUINETTI SOTTOSCRIFA: ESPERIENZA DI CAMPO

DIFFERENT FEED STRATEGIES FOR PIGLETS: PRACTICE EXPERIENCE

BRESAOLA M.¹, SALVINI F.¹, GUADAGNINI G.¹, PAOLETTI F.¹,
OTTOLINI F.¹, GIBELLINI M.²

¹Pig Vet, Brescia; ²Elanco AH

Parole chiave: mangime sottoscrofa, incremento medio giornaliero, peso allo svezzamento.
Key words: piglets feed creep, average daily gain, weaning weight.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the best piglets feed strategy in farrowing room in order to decide what kind of diet could be used in the farm where the study was performed. In a 700 sows herd were formed three different groups of piglets with three different diets: GV group which was provided a diet with sow's milk + *ad libitum* feed, a group GR which the food was rationed, and a control group GC which was made possible only access to the sow's milk. During the study individual batch of piglets were weighed at 1, 7, 14, 21 and 28 days of life and the feed intake was recorded for each group. It was also recorded the time that the laborer has taken to prepare and to administrate the food to the piglets. At weaning time piglets average weight was: 8.53 Kg GV - GR 8.47 Kg - GC 7.37 Kg. The study showed that piglets who were provided with a supplementary food + sow's milk gets an average daily gain (ADG) and a weaning weight higher. Economic analysis was conducted to quantify feed cost and the time taken by the operator to prepare and to administrate the feed: the work shows that the best strategy from an economic point of view is to adopt rationed diet as for GR group.

Riassunto

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la migliore strategia alimentare per suinetti sottoscrofa da utilizzare nell'allevamento in cui lo studio è stato condotto. In un allevamento di 700 scrofe sono stati formati tre differenti gruppi di suinetti sottoscrofa sottoposti a differenti regimi alimentari: gruppo GV a cui è stata fornita un'alimentazione a volontà costituita da latte scrofa + mangime, un gruppo GR a cui l'alimento mangime è stato razionato, ed un gruppo controllo GC al quale è stato reso possibile l'accesso al solo latte della scrofa. Durante lo studio sono state pesate le singole covate a 1, 7, 14, 21 e 28 giorni di vita ed è stato registrato il consumo di mangime di ogni gruppo di suinetti. Inoltre è stato registrato il tempo che il personale dell'allevamento ha impiegato per la preparazione e somministrazione degli alimenti. Allo svezzamento i suinetti presentavano un peso di: GV di 8,53 Kg - GR 8,47 Kg - GC 7,37 Kg. Lo studio ha dimostrato come i suinetti ai quali viene fornito un supplemento di alimento al latte materno manifestino un incremento medio giornaliero (IMG) e un peso superiore allo svezzamento a 28 giorni di vita. Dall'analisi economica condotta in riferimento al costo del mangime utilizzato e al tempo impiegato dall'operatore per la preparazione e distribuzione del mangime stesso, si può affermare che la migliore strategia alimentare da un punto di vista economico sia quella adottata per il gruppo GR.

INTRODUZIONE

L'utilizzo di mangimi sottoscrofa è una prassi consolidata nella moderna suinicoltura in quanto promuove le potenzialità digestive del suinetto, limita i disordini intestinali e favorisce l'ingestione complessiva nelle prime due settimane dopo lo svezzamento (McConnell *et al.* 1987; Mahan & Lepine 1991; Mahan *et al.* 1998; Klindt 2003). Tuttavia differenti studi presenti in letteratura dimostrano come non sempre il consumo di mangime sottoscrofa (latte e mangime solido) influenzi positivamente il peso allo svezzamento (Sulabo *et al.* 2010; Park *et al.* 2014). L'utilizzo di mangimi adatti all'alimentazione dei suinetti sottoscrofa può rappresentare per l'allevatore un costo elevato a causa del prezzo spesso ingente di questa tipologia di alimenti (Dunshea *et al.* 1999; Wolter *et al.* 2002). È quindi necessaria un'attenta analisi del rapporto costo/beneficio, al fine di valutare quale sia per ciascun allevamento la strategia alimentare ottimale da utilizzare.

MATERIALI E METODI

Lo studio, condotto in un allevamento di 700 scrofe (sito 1) localizzato in Pianura Padana, nella provincia di Verona, ha previsto la formazione di tre differenti gruppi di suinetti sottoscrofa sottoposti a differenti regimi alimentari per quanto concerne l'utilizzo di mangime: un gruppo GV a cui è stata fornita un'alimentazione "a volontà" (latte ricostituito e mangime solido), un gruppo GR a cui l'alimento è stato razionato (mangime solido razionato), ed un gruppo controllo GC al quale non è stato reso possibile l'accesso ad alcun alimento. Tutti e tre i gruppi di suinetti avevano libero accesso al latte materno. Per il gruppo GV sono state identificate 10 covate di suinetti, appartenenti a scrofe di differente ordine di parto (Tab.1), per un totale di 119 suinetti allo svezzamento. Per il gruppo GR e per il gruppo GC sono state identificate rispettivamente 8 covate (93 suinetti allo svezzamento) e 6 covate (73 suinetti allo svezzamento) (Tab.1). Tutti i suinetti coinvolti nella prova sono nati nella stessa sala parto, nella quale sono rimasti fino al momento dello svezzamento.

Tab.1: Gruppi di suinetti

Tab.1: Piglets groups

GRUPPO	N° COVATA	N° FIGLIATA SCROFA	SUINETTI PRESENTI A 1 GG	SUINETTI PRESENTI A 7GG	SUINETTI PRESENTI A 14GG	SUINETTI PRESENTI A 21GG	SUINETTI SVEZZATI A 28 GG
GV	1	1	13	13	13	13	12
GV	2	1	13	13	13	13	12
GV	3	1	13	13	13	13	13
GV	4	2	13	11	11	11	11
GV	5	3	13	12	12	12	11
GV	6	4	12	11	11	11	10
GV	7	5	14	14	13	13	13
GV	8	5	14	14	13	12	12
GV	9	6	13	13	13	12	12
GV	10	6	14	14	14	13	13
TOTALE GRUPPO GV			132	128	126	123	119
GR	1	1	11	12	12	12	12
GR	2	1	13	12	12	12	12
GR	3	2	12	12	12	12	12
GR	4	2	12	12	12	12	12
GR	5	3	11	11	11	11	11
GR	6	3	12	12	12	12	12
GR	7	4	14	12	11	11	11
GR	8	7	14	12	11	11	11
TOTALE GRUPPO GR			99	95	93	93	93
GC	1	1	12	12	12	12	11
GC	2	2	13	13	13	13	12
GC	3	2	14	14	14	14	14
GC	4	4	14	14	14	13	13
GC	5	6	13	13	12	12	11
GC	6	6	12	12	12	12	12
TOTALE GRUPPO GC			78	78	77	76	73

L'alimentazione del gruppo GV ha previsto la continua presenza di alimento a disposizione dei suinetti dal giorno successivo alla nascita fino allo svezzamento. Sono stati impiegati n°1 latte ricostituito per suinetti, n°2 mangimi sottoscrofa, n°1 mangime svezzamento, con una frequenza di 5 somministrazioni giornaliere. Il passaggio da un tipo di mangime all'altro è avvenuto in modo graduale, utilizzando nel momento del passaggio una miscela di due componenti (Tab.2). Il gruppo GR è stato alimentato con una quantità razionata di alimento. Sono stati impiegati: n°1 mangime sottoscrofa e n°1 mangime svezzamento, somministrati dal giorno 15 allo svezzamento, con una frequenza di 3 somministrazioni giornaliere (Tab.2).

Tab.2: Alimenti utilizzati e numero di somministrazioni

Tab.2: Feed used and number of administrations

PRODOTTO	gg di vita	gruppo GV	gruppo GR	gruppo GC
LATTE	1-7	5 somministrazioni gg	/	/
SOTTOSCroFA 1	8-20	5 somministrazioni gg	/	/
SOTTOSCroFA 2	15-25	5 somministrazioni gg	3 somministrazioni gg	/
SVEZZAMENTO	24-28	5 somministrazioni gg	3 somministrazioni gg	/

Durante lo studio sono state pesate le singole covate a 1 (pareggiamento), 7, 14, 21 e 28 (svezzamento) giorni di vita ed è stato registrato il consumo di mangime di ogni gruppo di suinetti. Inoltre è stato registrato il tempo che il personale dell'allevamento ha impiegato per la preparazione e somministrazione degli alimenti ai suinetti.

Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il software JMP®9.0.3 (2010SAS Institute Inc). E' stata condotta l'analisi della varianza (ANOVA), t-test, TUKEY-KRAMER HSD al fine di confrontare la variabilità esistente all'interno dei gruppi con quella tra i gruppi oggetto dello studio e verificare differenze statisticamente significative.

RISULTATI

I dati raccolti durante lo studio hanno dimostrato un differente accrescimento per i suinetti appartenenti ai tre gruppi sottoposti a diversi regimi di alimentazione. Il gruppo GV (alimentazione a volontà) a partire dal 7° giorno di vita ha sempre dimostrato un peso medio superiore rispetto agli altri gruppi, con un peso medio finale allo svezzamento di 8,53 Kg ed un incremento medio giornaliero (IMG) nell'arco dei 28 giorni di 250 grammi. Il gruppo GR (alimentazione razionata) allo svezzamento ha presentato un peso medio della nidiata di 8,47 Kg, di poco inferiore al gruppo GV ed un IMG di 248 grammi. Il gruppo GC (gruppo controllo) al quale durante tutti i 28 giorni di vita non è stato somministrato alcun tipo di mangime, ha mostrato un peso medio allo svezzamento di 7,37 Kg ed un IMG di 204 grammi. In Tab.3 sono riportati i pesi medi e l'IMG dei suinetti durante il periodo in cui è stata condotta la prova.

Tab.3: Pesi medi e IMG dei suinetti

Tab.3: Piglets average weight and ADG

GRUPPO	N° COVATA	PESO MEDIO SUINETTO 1 GG (Kg)	PESO MEDIO SUINETTO 7 GG (Kg)	PESO MEDIO SUINETTO 14 GG (Kg)	PESO MEDIO SUINETTO 21 GG (Kg)	PESO MEDIO SUINETTO 28 GG (Kg)	IMG SUINETTO 0- 7 GG (gr)	IMG SUINETTO 7- 14 GG (gr)	IMG SUINETTO 14- 21 GG (gr)	IMG SUINETTO 21- 28 GG (gr)	IMG SVEZZ.
GV	1	1,15	3,65	5,42	7,00	8,75	0,278	0,253	0,225	0,292	0,271
GV	2	1,15	3,04	4,85	6,46	9,08	0,314	0,258	0,231	0,437	0,283
GV	3	1,27	3,00	4,50	5,88	8,46	0,288	0,214	0,198	0,429	0,257
GV	4	1,92	2,50	4,18	6,05	7,91	0,072	0,240	0,266	0,311	0,214
GV	5	1,42	3,54	5,42	7,67	9,82	0,265	0,268	0,321	0,359	0,300
GV	6	1,96	3,82	5,95	8,00	9,80	0,207	0,305	0,292	0,300	0,280
GV	7	1,29	2,61	4,08	6,00	7,77	0,220	0,210	0,275	0,295	0,232
GV	8	1,79	2,21	3,88	5,96	7,96	0,071	0,239	0,296	0,333	0,220
GV	9	1,73	3,50	4,81	6,46	8,25	0,253	0,187	0,236	0,299	0,233
GV	10	1,61	2,39	3,89	5,81	7,92	0,131	0,214	0,274	0,353	0,226
GRUPPO GV media		1,53	3,00	4,67	6,51	8,53	0,211	0,239	0,262	0,338	0,250
GR	1	1,27	2,67	4,25	6,08	9,17	0,232	0,226	0,262	0,440	0,282
GR	2	1,62	2,88	4,50	6,25	8,92	0,252	0,232	0,250	0,381	0,261
GR	3	1,63	2,79	4,67	6,25	7,96	0,233	0,268	0,226	0,244	0,226
GR	4	1,08	2,33	3,58	5,83	7,92	0,250	0,179	0,321	0,298	0,244
GR	5	2,05	3,45	5,59	7,77	9,36	0,235	0,305	0,312	0,227	0,261
GR	6	1,63	3,00	4,92	6,92	7,79	0,229	0,274	0,286	0,125	0,220
GR	7	1,21	2,08	3,09	4,82	6,91	0,174	0,144	0,247	0,299	0,203
GR	8	1,79	2,67	4,64	7,18	9,77	0,176	0,281	0,364	0,370	0,285
GRUPPO GR media		1,53	2,73	4,40	6,38	8,47	0,199	0,240	0,283	0,298	0,248
GC	1	1,54	3,21	5,00	6,71	7,41	0,185	0,256	0,244	0,100	0,210
GC	2	1,81	2,88	4,12	6,15	7,92	0,215	0,176	0,291	0,252	0,218
GC	3	1,57	2,75	3,96	5,75	6,96	0,295	0,173	0,255	0,173	0,193
GC	4	1,61	2,64	4,21	5,62	6,92	0,173	0,224	0,200	0,187	0,190
GC	5	1,46	3,15	5,17	6,75	7,82	0,242	0,288	0,226	0,153	0,227
GC	6	1,92	2,92	3,54	5,67	7,33	0,200	0,089	0,304	0,238	0,193
GRUPPO GC media		1,65	2,92	4,32	6,09	7,37	0,212	0,200	0,253	0,183	0,204

Durante lo studio è stato rilevato il consumo di mangime, suddiviso per tipologia, per i gruppi GV e GR.

Come mostrato in Tab.4 si è registrato un consumo medio di mangime di 991 grammi per suinetto nel gruppo GV e di 583 grammi per suinetto nel gruppo GR, per un costo mangime per suinetto pari a 1,153 euro per GV e 0,387 euro per GR. Inoltre è stato misurato (Tab.5) il tempo necessario all'operatore per la preparazione e somministrazione delle varie tipologie

di mangime e quindi quantificato il costo preparazione&somministrazione in 0,809 euro per suinetto per GV e 0,181 euro per suinetto per GR (costo operatore pari 15 euro/ora lavorativa). Il costo alimentazione per ciascun suinetto, dato dalla somma del costo mangime e costo preparazione&somministrazione, è risultato pari a 1,96 euro per GV e 0,57 euro per GR.

TAB.4: costo mangime per suinetto
TAB.4: feed cost per piglet

PRODOTTO	Kg SUINETTO	euro/Ql	euro/SUINETTO
GRUPPO GV			
LATTE	0,100	250	0,250
SOTTOSCROFA 1	0,290	174	0,504
SOTTOSCROFA 2	0,295	73	0,215
SVEZZAMENTO	0,306	60	0,184
TOT	0,991		1,153
GRUPPO GR			
SOTTOSCROFA 2	0,285	73	0,208
SVEZZAMENTO	0,298	60	0,179
TOT	0,583		0,387

TAB.5: costo preparazione/somministrazione per suinetto
TAB.5: preparation/administration cost per piglet

PRODOTTO	GG SOMMINISTR AZIONE	N° SOMMINISTR AZIONI	MIN. PRE/SOM.	TOT MIN	COSTO MANOD (euro)	COSTO SUINETTO (euro)
GRUPPO GV						
LATTE 1	7	5	5	175	43,75	0,368
SOTTOSCROFA 1	7	5	2	70	17,50	0,147
SOTTOSCROFA 2	7	5	2	70	17,50	0,147
SVEZZAMENTO	7	5	2	70	17,50	0,147
TOT						0,809
GRUPPO GR						
SOTTOSCROFA 2	7	3	1,6	33,6	8,4	0,090
SVEZZAMENTO	7	3	1,6	33,6	8,4	0,090
TOT						0,181

DISCUSSIONE

Dall’analisi tra i tre gruppi oggetto dello studio non emergono differenze di peso statisticamente significative a 1 (pareggiamento), 7, 14 e 21 giorni di vita (Fig.1; Fig.2; Fig.3; Fig.4).

Fig.1: peso a 1 giorno di vita
Fig.1: weight at day 1

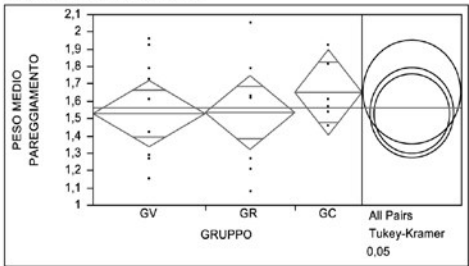


Fig.2: peso a 7 giorni di vita
Fig.2: weight at day 7

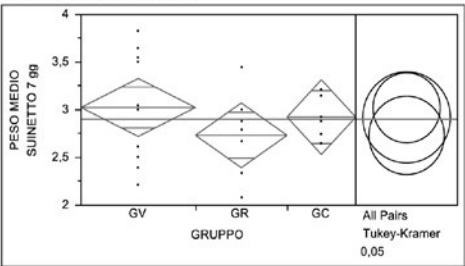


Fig.3: peso a 14 giorni di vita
Fig.3: weight at day 14

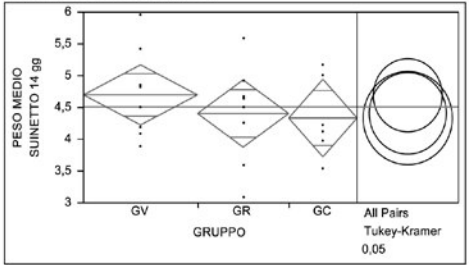
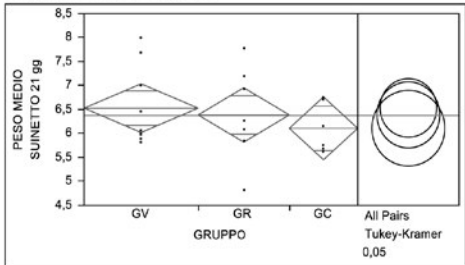


Fig.4: peso a 21 giorni di vita
Fig.4: weight at day 21

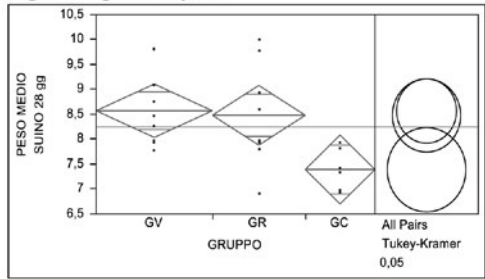


Tuttavia dai dati ottenuti si può osservare una differenza statisticamente significativa fra il peso allo svezzamento dei suinetti appartenenti ai gruppi GV e GC ($p>0,05$) (Fig.5). Non risulta invece essere presente una differenza statisticamente significativa fra i pesi allo svezzamento fra i gruppi GV e GR.

I dati raccolti dimostrano come diverse tipologie di alimentazione non influenzino in modo statisticamente significativo il peso dei suinetti sottoscrofa fino ai 21 giorni di vita. Questa considerazione trova riscontro con quanto già affermato da altri autori in studi precedenti (Sulabo *et al.* 2010; Park *et al.* 2014). Risulta invece importante l'integrazione al latte materno nel periodo compreso fra 21 e 28 giorni vita, consentendo di fatto un peso allo svezzamento superiore di 1,16 Kg e 1,10 Kg rispettivamente di GV e GR in confronto a GC.

Fig.5: peso a 28 giorni di vita

Fig.5: weight at day 28



D’analisi economica dei dati ottenuti nella prova si è arrivati a determinare il costo alimentazione per ciascun suinetto pari a 1,96 euro per GV, 0,57 euro per GR e 0 ,00 euro per GC. Facendo riferimento al prezzo medio dei suini di peso 7 Kg per l’anno 2014 del mercato di Modena (46,69 euro) è stato possibile determinare un prezzo medio di vendita dei suinetti appartenenti ai tre gruppi rispettivamente di 56,90 euro per GV, 56,49 euro per GR e 49,16 per GC. Sottraendo al prezzo di vendita dei suinetti il costo alimentazione si può verificare come la strategia alimentare migliore (rapporto costo/beneficio) per l’allevamento oggetto dello studio risulti essere quella del gruppo GR, ovvero quella del gruppo di suinetti alimentato in modo razionato a partire dal 15° giorno di vita.

TAB.6: analisi economica

TAB.6: economic analysis

GRUPPO	PESO VEND (Kg)	DIFF PESO (Kg)	PREZZO VENDITA (euro)	COSTO MANGIME (euro)	RICAVO (euro)
GV	8,53	1,16	56,90	1,96	54,93
GR	8,47	1,10	56,49	0,57	55,92
GC	7,37	0,00	49,16	0,00	49,16

BIBLIOGRAFIA

McConnell JC, Eargle JC, Woldorf RC. 1987. Effects of weaning weight, co-mingling, group size and room temperature on pig performance. *Journal of Animal Science* **65**, 1201–1206

Mahan DC, Lepine AJ. 1991. Effect of pig weaning weight and associated nursery feeding programs on subsequent performance to 105 kilograms body weight. *Journal of Animal Science* **69**, 1370–1378.

Mahan DC, Cromwell GL, Ewan RC, Hamilton CR, Yen JT. 1998. Evaluation of the feeding duration of a phase 1 nursery diet to three-week-old pigs of two weaning weights. *Journal of Animal Science* **76**, 578–583.

Klindt J. 2003. Influence of litter size and creep feeding on preweaning gain and influence of preweaning growth on growth to slaughter in barrows. *Journal of Animal Science* **81**, 2434–2439.

Sulabo RC, Tokach MD, Dritz SS, Goodband RD, DeRouchey JM, Nelssen JL. 2010b. Effects of varying creep feeding duration on the proportion of pigs consuming creep feed and neonatal pig performance. *Journal of Animal Science*. **88**, 3154–3162.

Wolter BF, Ellis M, Corrigan BP, DeDecker JM. 2002. The effect of birth weight and feeding of supplemental milk replacer to piglets during lactation on preweaning and postweaning growth performance and carcass characteristics. *Journal of Animal Science* **80**, 301–308.

DeRouchey JM, Goodband RD, Tokach MD, Nelssen JL, Dritz SS. 2010. Nursery swine nutrient recommendations and feeding management. *National Swine Nutrition Guide*, pp. 65–79. U.S. Pork Center of Excellence (USPCE), Iowa State University, Ames, IA, USA.

STUDIO PRELIMINARE DEL PROFILO FERMENTATIVO DELLE BRODE PER SUINI IN FUNZIONE DELLA LORO COMPOSIZIONE

PRELIMINARY STUDY OF THE FERMENTATIVE PROFILE OF LIQUID FEEDS FOR SWINE ACCORDING TO THEIR COMPOSITION

BAZZOLI A.¹, DEMEY V.², GUILLOU D.², HOCKE N.¹.

1 Lallemand Animal Nutrition - Italia

2 Lallemand Animal Nutrition - Francia

Parole chiave: Broda, fermentazioni, pH, AGV, Lattobacilli.

Key words: Liquid feed, fermentation, pH, VFA, Lactic bacteria

Riassunto

Allo scopo di monitorare il profilo fermentativo dei diversi tipi di broda più utilizzati nella pratica di allevamento dei suini all'ingrasso nel Nord Italia, e l'eventuale effetto di ingredienti diversi su quest'ultimo, sono stati analizzati 44 campioni di broda prelevati da 41 allevamenti diversi. Tutti i campioni sono stati testati per S.S., pH, Etanolo e A.G.V. (Ac. Acetico, Ac. Iso-butyrrico, Ac. N-butyrrico, Ac. Lattico, e Ac. Propionico). In base alla loro composizione le brode sono state classificate in 4 gruppi. Le brode composte da sola acqua e mangime avevano un pH più alto e un minor contenuto in ac.lattico e acetico rispetto a quelle contenenti anche pastone di mais e/o siero. Le brode contenenti pastone di mais hanno fatto registrare i livelli più alti di etanolo. E' stata rilevata una forte correlazione tra concentrazione di ac. lattico e pH, e tra lattico e acetico. Gli acidi propionico, iso-butyrrico e N-butyrrico sono stati rilevati in piccole quantità solo in una parte dei campioni. Un effetto numerico sul pH è stato osservato nelle brode che impiegavano acidificanti o lattobacilli. Inoltre, nelle brode con l'aggiunta di lattobacilli è stato evidenziato un aumento significativo del contenuto di ac. acetico ed un aumento numerico dell' ac. lattico. Non sono state rilevate differenze significative sulle performance di allevamento delle 4 tipologie di broda.

Abstract

In order to monitor the fermentation profile of different types of liquid feeds used in fattening pigs in northern Italy, and the possible effect of different ingredients on the fermentation, 44 samples of soup taken from 41 different farms were analyzed. All samples were tested for D.M., pH, Ethanol and VFA (Acetic ac., Iso-butyric and N-butyric ac., Lactic ac. and Propionic ac.). The soups were classified into 4 groups according to their formulation. The soups composed of only water and feed had a higher pH and a lower content of lactic and acetic acid compared to those containing High Moisture Corn and / or whey. Soups containing HMC showed higher levels of ethanol. A strong correlation was found between the concentration of lactic acid and pH and between lactic and acetic acid. Propionic acid, iso-butyric acid and N-butyric acid were detected in low quantities only in a part of the samples. A numerical effect on pH was observed in soups which contained added acidifiers or Lactic Acid Bacteria. Soups containing added LAB reported a statistically significant effect for a higher content in acetic acid and a numerical higher content of lactic acid. There were no significant differences on farm's performances between the 4 types of liquid feeds.

INTRODUZIONE

L'alimentazione dei suini all'ingrasso con alimento liquido è una pratica ricorrente e tradizionale nel Nord Italia. Questo tipo di somministrazione dell'alimento è considerato particolarmente vantaggioso per la facilità e la rapidità di distribuzione, l'appetibilità e la possibilità di un maggior utilizzo di materie prime di produzione aziendale (pastone di mais) e la possibilità di valorizzare una parte di sottoprodotti liquidi dell'industria (siero, distillers ecc). L'alimento liquido in genere è composto da una diluizione delle materie prime secche con acqua o siero fino ad ottenere una broda con un SS media compresa tra il 15 ed 25% (Tab. 1). Questo livello elevato di umidità innesca l'attività della flora microbica presente nelle materie prime ed i prodotti di queste fermentazioni microbiche possono essere molto variabili in base al tipo di microrganismi presenti nei vari componenti del mangime ed alla flora presente nell'impianto di preparazione e distribuzione (biofilm). [3,5,11,12]. Dato l'elevato contenuto in amido e zuccheri fermentescibili nelle diete per suini all'ingrasso, l'alimento liquido è un substrato ideale per la fermentazione microbica. Normalmente la flora predominante della broda dovrebbe essere quella lattica, tuttavia diversi fattori esterni tra i quali: flora epifitica delle materie prime, condizione di stoccaggio, temperatura ambientale, ecc. possono variare il microbiota presente nell'alimento liquido con il rischio di sviluppo di batteri indesiderati quali coliformi, clostridi e salmonelle [3,5,11]. Per ovviare a questo rischio è auspicabile favorire lo sviluppo di abbondante flora lattica la quale è in grado di contrastare la crescita dei patogeni sia per competizione sia creando un ambiente sfavorevole alla loro moltiplicazione grazie alla produzione di AGV i quali abbassano il pH del substrato [3,4,5,11]. Per questo motivo è comune il ricorso ad additivi quali acidificanti e batteri lattici per controllare il pH e/o le fermentazioni della broda[2,11,13]. Lo scopo del presente studio era monitorare il profilo fermentativo dei diversi tipi di broda più utilizzati nella pratica di allevamento dei suini all'ingrasso nel Nord Italia, per verificare se ingredienti diversi (inclusa l'acqua) influenzano il pH, il profilo fermentativo della broda e se questi parametri abbiano un legame con le performance di ingrasso.

Tabella 1. Livelli di sostanza secca rilevati nei campioni analizzati.

Table 1. Dry matters levels detected in analyzed sample.

	Media ($\pm$ DS)	Minima	Massima
Sostanza Secca Broda %	21.19 $\pm$ 4.25	13.48	32.38

MATERIALI E METODI

Lo studio ha avuto luogo, dal 18 Marzo al 5 Giugno e dal 28 Agosto al 17 Ottobre 2014. E' stato appositamente tralasciato il periodo estivo, per evitare l'influenza delle alte temperature sulle fermentazioni della broda.

L'indagine ha riguardato 41 allevamenti diversi siti nelle province di Bs, Cr, Mn, Mo, Tn e Vr. Di questi allevamenti 21 erano siti d'ingrasso e 20 erano a ciclo chiuso.

Da questi allevamenti sono stati prelevati 44 campioni, in doppio falcone da 500 ml con tappo a vite, di broda destinata a suini nella fase di ingrasso, peso vivo tra i 100 e 170 kg. La scelta è ricaduta su questa fase poiché le formulazioni destinate ai suini grassi hanno minor variabilità nei componenti. Il prelievo dei campioni è stato eseguito nel box dei suini, prelevando la broda dal condotto di distribuzione, direttamente dal foro di uscita di quest'ultima.

Al momento del prelievo inoltre, sono stati registrati i seguenti parametri: pH dell'acqua (utilizzata per la broda), pH della broda, temperatura ambiente e temperatura della broda. Per la misurazione della temperatura in allevamento è stato utilizzato un termometro digitale con sonda da 120 mm, e risoluzione 0.1°C, per la misurazione del pH è stato utilizzato un pHmetro portatile con una risoluzione di 0,1.

Tutti i campioni sono stati analizzati presso un unico laboratorio accreditato per S.S., pH, Etanolo e A.G.V. (Ac. Acetico, Ac. Iso-butirrico, Ac. N-butirrico, Ac. Lattico, e Ac. Propionico). Per l'analisi della S.S. è stato utilizzato il metodo gravimetrico, mentre per l'analisi degli A.G.V. ed etanolo è stata utilizzata la gascromatografia secondo il metodo di Fussell e McCalley [7]. I campioni prima di essere consegnati al laboratorio sono stati congelati tutti nello stesso momento, 6h dopo il prelievamento, al fine di poterli comparare tra loro. Durante il trasporto e lo stoccaggio i campioni prelevati sono stati mantenuti a una temperatura compresa tra 16 e 21°C. Le temperature minime e massime di stoccaggio sono state registrate utilizzando un termometro digitale.

Al momento del campionamento sono state registrate ulteriori informazioni in merito alla formulazione della broda: utilizzo di sottoprodotti (nel caso di utilizzo di sotto prodotti liquidi a questi è stato misurato il pH), eventuale utilizzo e tipo di antibiotici e/o altre sostanze inibenti (H_2O_2 , Cl, $CuSO_4$, ZnO), presenza di acidificanti e Lattobacilli. Sono state prese in considerazione anche le performance di allevamento registrando I.P.G. , I.C.A., e la mortalità generale (nella fase d'ingrasso) nei sei mesi precedenti al momento dell'indagine.

Analisi statistica: Per il confronto tra i dati medi dei gruppi è stato applicato il metodo GLM univariato, mentre per il confronto dei dati inseriti in grafico è stata effettuata una correlazione di tipo lineare.

RISULTATI

Le brode analizzate sono classificabili in 4 tipologie

Tipo A Mangime + acqua - 15 Campioni

Tipo B Mangime+ pastone + acqua - 14 Campioni (Contenuto medio di pastone 50% stq)

Tipo C Mangime + siero + acqua - 8 Campioni (Contenuto medio di siero 25% stq)

Tipo D Mangime + pastone+ siero + acqua - 7 Campioni (Contenuto medio di pastone 30% stq, contenuto medio di siero 15% stq)

Risultati relativi al pH

Il pH delle brode al momento del prelievo variava da un minimo di 4,5 ad un massimo di 6,4.

Il pH dell'acqua è risultato molto variabile nei vari allevamenti da 6,90-8,60. Il pH dei sottoprodotti lattiero-caseari variava da 3,40 a 6,10. Il pH del pastone di mais non è stato misurato.

Le brode di tipo A avevano un pH medio (5,80) più elevato delle brode di tipo B, C, e D al momento del prelievo (4,9/4,8). Tuttavia l'andamento del pH a 6 ore è stato diverso a seconda della composizione della broda. Nelle brode contenenti mangime e acqua il pH a 6 ore era inferiore a quello al prelievo, mentre negli alimenti a base di Mangime siero e/o pastone il pH dopo 6 h era uguale o superiore a quello al momento del prelievo (Tab. 2) (Fig. 1). Il pH dell' H_2O non è risultato correlato significativamente al pH della Broda.

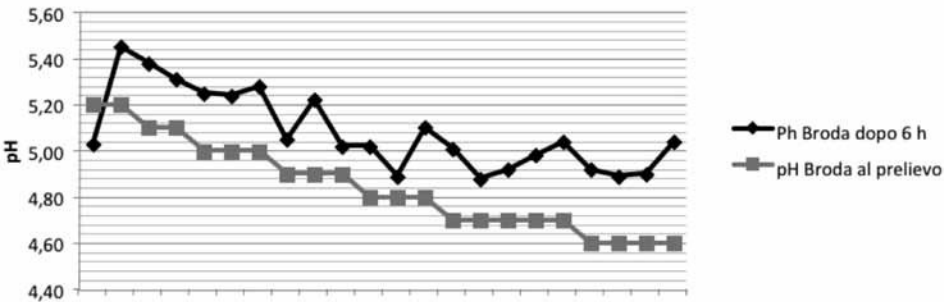
In 16 allevamenti che hanno segnalato l'utilizzo di prodotti commerciali a base di acidi e loro sali (propionico, formico, lattico, acetico) è stato riscontrato un abbassamento numerico del pH ma non significativo.

In 7 allevamenti utilizzatori di batteri lattici (P. acidilattici MA18/5M) è stato riscontrato un abbassamento numerico del pH ma non significativo.

Tabella 2. Profilo fermentativo e pH caratteristico per ciascun tipo di broda.
Table 2. Characteristic fermentative profile and pH per each type of soup.

Tipologia di Broda		pH Broda	pH Dopo 6h	Ac. Lattico (gr/kg SS)	Ac. Acetico (gr/Kg SS)	Etanolo (gr/Kg SS)
Tipo A	Media	5.8 a	5.3 A	30.6 a	3.43 a	2.99 a
	ESm	0.077	0.103	4.260	0.514	1.641
Tipo B	Media	4.9 b	5.1 AB	35.4 a	4.26 ab	10.79 b
	ESm	0.053	0.053	4.169	0.281	2.044
Tipo C	Media	4.9 b	5.0 B	59.3 b	4.11ab	6.10ab
	ESm	0.227	0.141	9.475	0.392	2.772
Tipo D	Media	4.8 b	5.0 AB	56.0 b	5.63 b	11.47 b
	ESm	0.075	0.075	5.102	0.722	1.629
P-value		<0.05	<0.1	<0.05	<0.05	<0.05

Figura 1. Valore del pH delle brode con pastone di mais al prelievo e dopo 6 h
Figure 1. pH of soups containing HMC at sampling and after 6h



Risultati relativi agli AGV ed all'etanolo

Il contenuto in acido lattico era correlato sia al pH ($p < 0.01$) (Fig. 2), sia alla temperatura della broda al prelievo ($p < 0.01$). E' stata inoltre rilevata correlazione tra acido lattico ed acido acetico. E' noto che numerose specie di batteri lattici sono eterofermentanti e quindi è plausibile la relazione tra questi due composti [1,6,10]

Le brode di tipo A e B avevano un contenuto medio di acido lattico di circa la metà rispetto alle brode di tipo C e D (Tab 2). La temperatura dei campioni al prelievo aveva una

correlazione positiva con il contenuto di acido lattico ($P < 0.01$).

L'acido propionico è stato riscontrato in 13 campioni, non appare condizionato dalla composizione della broda ed è stato riscontrato indipendentemente dall'aggiunta o meno di miscele di additivi contenenti questo acido. Inoltre, i campioni in cui era presente il propionico presentavano un contenuto numericamente più elevato di etanolo rispetto agli altri campioni. La relazione tra questi due composti andrebbe ulteriormente verificata con altri prelievi.

L'acido Iso-butyrico ed N-butyrico sono stati individuati in piccole quantità (0,2 -0,9 g/kg/ss) in 10 campioni e non appaiono legati ad alcuna tipologia di broda. La presenza di acido butyrico non è di per sé negativa ma è rilevante in quanto potrebbe essere spia di fermentazioni di batteri non desiderabili quali i clostridi.

L'etanolo è stato rilevato in tutti i campioni da un minimo di 0,3 g/kg/ss a 28,1 g/kg di ss. Le brode contenenti pastone di mais presentano un maggior contenuto in etanolo statisticamente significativo rispetto alla brode contenenti solo mangime e acqua e/o siero (Fig. 1). Il pastone di mais può essere la fonte diretta di etanolo o apportare lieviti i quali a loro volta in anaerobiosi possono produrre etanolo a partire dagli zuccheri presenti nella broda [11].

In 16 allevamenti che hanno segnalato l'utilizzo di prodotti commerciali a base di acidi e loro sali (propionico, formico, lattico, acetico) non è stato riscontrato alcun effetto sul profilo fermentativo della broda (Tab. 3).

In 7 allevamenti utilizzatori di batteri lattici (*P. acidilactici* MA18/5M) è stato riscontrato un quantitativo di acido acetico più elevato ($P < 0.10$) ed un quantitativo numericamente maggiore di acido lattico (Tab. 3).

Grafico 1. Inclusione di pastone di mais e livelli di etanolo (g/kg SS).

Graph 1. Inclusion of HMC and ethanol levels (g/kg DM)

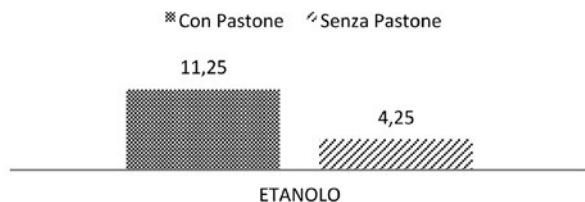


Figura 2. Relazione tra contenuto di Ac.lattico e pH della broda al campionamento.

Figure 2. Relationship between Lactic acids and pH of soup at sampling.

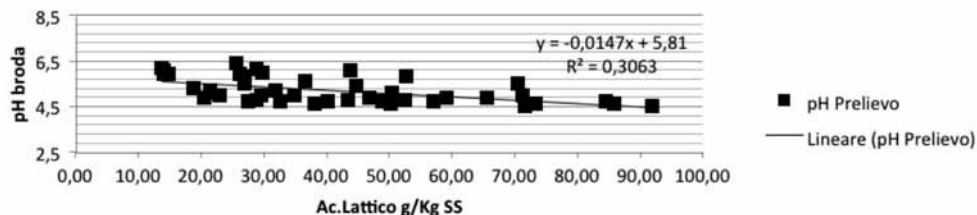


Tabella 3. Confronto tra inclusione di Lattobacilli ed Acidificanti.**Table 3.** Comparison on inclusion between Lactic acid bacteria and Acidifiers.

<i>Tipo di Additivo</i>	<i>Inclusione nella broda</i>	<i>pH</i>	<i>Ac. Lattico (gr./Kg SS)</i>	<i>Ac. Acetico (gr./Kg SS)</i>	
<i>Acidificanti</i>	<i>NO</i>	<i>Media</i>	5,3	40,96	4,14
		<i>ESm</i>	0.104	3.969	0.342
		<i>N</i>	27	28	28
	<i>SI</i>	<i>Media</i>	5,05	42,1	4,19
		<i>ESm</i>	0.137	5.55	0.375
		<i>N</i>	16	16	16
<i>Lattobacilli</i>	<i>NO</i>	<i>Media</i>	5,28	39,01	3,91*
		<i>ESm</i>	0.099	3.572	0.259
		<i>N</i>	34	35	35
	<i>SI</i>	<i>Media</i>	5,00	51,66	5,20*
		<i>ESm</i>	0.113	8.686	0.824
		<i>N</i>	7	7	7

*P<0.10

Performance di allevamento

Le tipologie di broda non hanno registrato differenze significative tra loro per quanto riguarda le performance di allevamento (IPG, ICA e mortalità). Tuttavia la mortalità media inferiore è stata registrata con brode di tipo C (siero e mangime) e quella maggiore nelle brode di tipo A (acqua e mangime) (Tab. 4).

La mortalità inoltre mostra un livello numericamente ma non significativamente più elevato negli allevamenti in cui è stato riscontrato acido butirrico nella broda. Questa tendenza andrebbe verificata con un maggior numero di campioni.

Non appaiono correlazioni evidenti tra pH della broda e mortalità, tuttavia negli allevamenti con brode più acide (pH < 4,90) la mortalità tende a valori inferiori anche se non statisticamente significativi. Una soglia di pH inferiore a 5 è considerata efficace nell'inibire la proliferazione di coliformi, clostridi e salmonelle [4,9].

Tabella 4. Performance di allevamento e tipologia di broda.**Table 4.** Farm's performances and type of soup (ADG, FCR and Mortality).

Tipologia di Broda		I.P.G. (g)	I.C.A.	MORTALITA' (%)
Tipo A	Media	711	3,60	2,88
	DS	±45	±0,30	±1,43
Tipo B	Media	724	3,46	2,78
	DS	±51	±0,22	±1,48
Tipo C	Media	736	3,57	1,84
	DS	±69	±0,32	±0,99
Tipo D	Media	721	3,69	2,65
	DS	±19	±0,16	±0,78

CONCLUSIONI

Il pH ed il profilo fermentativo delle brode sono diversi a seconda della tipologia degli ingredienti impiegati.

Il pH dell'alimento liquido al prelievo è molto superiore nel tipo A rispetto alle altre tipologie. La presenza di siero (Tipo C e D) sembra influenzare in modo rilevante il contenuto di acido lattico ed acetico delle brode rispetto alle altre tipologie. Vi sono correlazioni tra pH, temperatura della broda ed acido lattico e tra acido lattico ed acido acetico. Sembra esservi un legame tra presenza di acido propionico e livello di etanolo ma è necessario approfondire con ulteriori dati.

Il butirrico è raramente presente e non appare legato alla tipologia di broda ma potrebbe avere un nesso con la mortalità.

Per quanto riguarda l'aggiunta di additivi tecnologici, sia i pool di acidi sia i batteri lattici hanno avuto un effetto numerico sull'abbassamento del pH. Inoltre, le brode con aggiunta di batteri lattici avevano un contenuto numericamente più elevato di acido lattico ed quantitativo significativamente maggiore di acido acetico.

Livelli più elevati di etanolo rispetto alla media sono stati riscontrati nelle brode che contenevano pastone di mais.

Non è stata evidenziata alcuna relazione tra la tipologia della broda e le performance in allevamento. Tuttavia possiamo azzardare ad individuare alcune tipologie di brode "a rischio" per quanto riguarda la proliferazione di patogeni. Le brode con solo mangime e acqua, in quanto presentano il pH più elevato e meno acido lattico al momento della preparazione, e le brode contenenti pastone per la loro tendenza ad innalzare il pH nel tempo. Quest'ultimo potrebbe essere dovuto all'attività fermentativa di alcuni lieviti specifici che sono in grado di trasformare il Lattico in CO_2 e H_2O [11]. Questo fenomeno peraltro è molto comune negli insilati al momento dell'apertura della trincea.[8,11].

In questo lavoro abbiamo preso in considerazione solo alcuni tra i fattori che possono influenzare le fermentazioni che avvengono nell'alimento liquido per suini. Il profilo fermentativo è risultato molto variabile a seconda della composizione delle brode ma simile tra quelle contenenti ingredienti simili. Tuttavia, il microbiota e le fermentazioni in un substrato così complesso possono essere influenzati da numerosi fattori che andrebbero approfonditi in studi successivi.

BIBLIOGRAFIA

- Adler-Nissen J., Demain A.L. (1994), "Aeration-controlled formation of acetic acid in heterolactic fermentations", *Journal of Industrial Microbiology* Vol. 13, 335-343.
- Brooks P.H., Beal J.D. (2005), "Liquid feeding of pigs: implication for pig and human health", *Proceedings of the 2005 Manitoba Swine Seminar*
- Brooks P.H., Beal J.D., Niven S. (2001), "Liquid feeding of pigs: potential to reducing environmental impact and for improving productivity and food safety", *Recent advance in animal nutrition in Australia* Vol. 13, 49-63.
- Dujardin M., Elain A., Lendormi T., Le Fellic M., Le Treut Y., Sire O. (2014), "Keeping under control a liquid feed fermentation process for pigs: A reality scale pilot based study", *Animal Feed Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.017>
- Fantinati P. (2008), "Così l'alimentazione liquida difende la salute dei suini", *Suinicoltura* 2, 40-46.

- Fleming H.P., McFeeters R.F., Daeschel M.A. (1985), "The Lactobacilli, Pediococci and Leuconostocs: Vegetable products. In: Bacterial Starter Cultures for Foods", Gilliland, S.E., ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 97-118.
- Fussell R.J. and McCalley D.V. (1987), "Determination of volatile fatty acids (C2-C5) and lactic acid in silages by gas chromatography". *Analyst*. 1987 vol. 112, 1213-1216.
- Kung L. (2010), "Understanding the biology of silage preservation to maximize quality and protect the environment", California Alfalfa & Forage Symposium and Corn/Cereal Silage Conference, Visalia, CA, 1-2 December, 2010 (consultare <http://alfalfa.ucdavis.edu> per scaricare il lavoro pubblicato).
- Le Treut Y. (2010), "Principes et intérêts de la soupe fermentée en alimentation porcine", Comunicazione personale.
- Lonvaud-Funel A. (1999), «Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine», *Antonie van Leeuwenhoek* Vol. 76, 317-331.
- Olstorpe M., Karin L., Lindberg J.E., Schnurer J., Passoth V. (2008), "Population diversity of lactic acid bacteria in pig fermented with whey, wet wheat distillers' grains or water at different temperatures", *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 74 n° 6, 1696-1703.
- Pahlow G., Muck R. E., Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H., Spoelstra S. F. (2003), "Microbiology of ensiling", Eds. Buxton, Madison, Wisconsin, USA: American Society of Agronomy, 31-93.
- Plumed-Ferrer C., von Wright A. (2008), "Fermented pig liquid feed: nutritional, safety and regulatory aspects" *Journal of Applied Microbiology* 106, 351-368.

CONTAMINAZIONE DA *SALMONELLA* SPP. IN DUE MATTATOI DEL CENTRO ITALIA: UN APPROCCIO QUANTITATIVO

CONTAMINATION BY *SALMONELLA* SPP. IN TWO SLAUGHTERHOUSES IN CENTRAL ITALY: A QUANTITATIVE APPROACH

MASSACCI F.R., CIUTI F., CUCCO L., DE LUCA S., MARESCA C., MEDICI L., PANICCIÀ M., SCOCCIA E., SILENZI V., PEZZOTTI G., MAGISTRALI C.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM)

Parole chiave: *Salmonella* spp., suini, carica

Keywords: *Salmonella* spp., swine, load

Riassunto

Scopo di questo lavoro è stato quello di indagare il livello di contaminazione da *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali e sulle carcasse di suini macellati presso due mattatoi del Centro Italia. Il campionamento è stato effettuato con l'obiettivo di stimare la prevalenza di suini fortemente contaminati (carica ciecale ≥ 3 log) da *Salmonella* spp. pari al 12%. Prima della macellazione sono stati prelevati tamponi ambientali. I livelli di prevalenza di *Salmonella* spp. da contenuto ciecale sono stati pari a 17,33% (IC95% 15%-20%) nel mattatoio A ed a 34,64% (IC95% 29,37%-40,30%) nel mattatoio B. La prevalenza di *Salmonella* spp. nei tamponi carcassa è stata rispettivamente dello 0,67% (IC95% 0,42%-1,46%) e del 7,19% (IC95% 4,66%-10,84%). I risultati quantitativi mostrano una prevalenza di suini fortemente contaminati pari al 7% (IC95% 4,49%-10,66%) nel mattatoio A e 11,44% (IC95% 8,20%-15,67%) nel B. Nel mattatoio A tutti i tamponi ambientali sono risultati negativi, mentre nel B 7/59 erano positivi, con la presenza dello stesso sierotipo sulle carcasse macellate nella stessa giornata. I sierotipi più frequenti sono stati *S. Derby*, variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), nel 75% caratterizzata da resistotipo ASSuT. In conclusione, i livelli di contaminazione differivano nei due mattatoi, probabilmente in ragione delle caratteristiche strutturali degli stessi. I suini hanno presentato differenti livelli di contaminazione ciecale da *Salmonella*, con un livello di prevalenza non trascurabile di suini fortemente contaminati.

Abstract

The aim of this work was to investigate the contamination by *Salmonella* spp. in cecal contents and carcass swabs collected at two slaughterhouses in Central Italy. The sample size was calculated to estimate a 12% prevalence of pigs highly contaminated by *Salmonella* spp. (HCP, cecal load ≥ 3 log). Environmental swabs were taken before slaughter on each day. The prevalence of *Salmonella*-positive cecal contents was estimated as 17,33% (CI95% 15%-20%) in slaughterhouse A, and 34,64% (CI95% 29,37%-40,30%) in slaughterhouse B, whereas *Salmonella*-positive carcass swabs was estimated as 0,67% (CI95% 0,42%-1,46%) and 7,19% (CI95% 4,66%-10,84%), respectively. The HCP prevalence was 7% (CI95% 4,49%-10,66%) in slaughterhouse A and 11,44% (CI95% 8,20%-15,67%) in slaughterhouse B. All the environmental swabs from slaughterhouse A tested negative for *Salmonella* spp. In slaughterhouse B, 7 out of 59 environmental swabs tested positive, with the same serotype isolated from the environment and from carcasses of the same day. The prevalent serotypes were *S. Derby*, *S. 4,[5],12:i:-*, with ASSuT being the most common (75%) resistotype of

S. (4,[5],12:i:-). In conclusion, the *Salmonella* spp. contamination was different in the two slaughterhouses and this was probably due to an abattoir effect. Pigs showed different loads of *Salmonella* spp. in caeca, with a non-negligible prevalence of highly contaminated pigs.

INTRODUZIONE

L'infezione da *Salmonella* spp. è una delle zoonosi più diffuse tra quelle che vengono trasmesse attraverso gli alimenti (EFSA, 2012); la carne suina, dopo le uova e la carne di pollo, rappresenta una delle più importanti fonti di contaminazione per l'uomo (EFSA, 2006). Da un decennio, anche grazie all'applicazione dei piani di controllo per *Salmonella enterica* nel comparto avicolo, si è assistito ad una riduzione progressiva dei casi nell'uomo nella comunità europea (EFSA, 2014). Allo stesso tempo, è accresciuta proporzionalmente l'importanza di altre fonti di *Salmonella* spp., tra cui quello della carne suina (EFSA, 2015). Da un recente studio dell'EFSA è emerso infatti che in Italia il 73% dei casi di salmonellosi registrati nell'uomo sono riconducibili al suino (Pires, 2012).

La struttura della filiera produttiva del suino è molto diversa da quella avicola, e questo rende l'applicazione di piani di controllo per *Salmonella* spp. più complessa.

Pertanto una migliore conoscenza della contaminazione da *Salmonella* spp. lungo la filiera produttiva, dall'allevamento alla macellazione, fino al prodotto finito, può contribuire a impostare programmi di riduzione del rischio. Tuttavia, per una corretta stima di questo sono necessari dati di carattere quantitativo (Kramer, 2011). È chiaro, come sottolineato da un report EFSA, che il rischio contaminazione non sia legato solamente alla presenza/assenza del batterio, ma anche alla carica batterica associata (EFSA, 2008). Infatti, i processi produttivi che seguono la macellazione sono in grado di ridurre la carica microbica batterica, ma l'efficacia di questo processo dipende dal livello di contaminazione iniziale del campione (van Hoek, 2012). La maggior parte dei dati disponibili in letteratura si limitano a valutazioni di tipo qualitativo, riportando le variazioni di prevalenza di *Salmonella* spp. nei diversi comparti lungo la filiera.

Nonostante siano disponibili pochi dati in merito all'entità delle escrezioni fecali di *Salmonella* spp. nei suini infettati naturalmente, 100 ufc/g rappresentano il valore riscontrato più frequentemente, ad eccezione di casi di salmonellosi clinica o in prossimità del momento di infezione, durante i quali tali valori tendono ad essere più elevati (EFSA, 2008). Livelli di escrezione riscontrabili in condizioni naturali sono stati infatti recentemente descritti da Pires (2013), che hanno registrato la sporadica presenza di suini eliminatori di cariche batteriche elevate (*high shedder*) raggruppati in piccoli *cluster*. Modelli matematici che hanno valutato le modalità di trasmissione di *Salmonella* spp. nel magronaggio e ingrasso hanno attribuito un ruolo chiave al numero di *high shedder* nella diffusione dell'infezione in allevamento (Smid, 2014).

È stato ipotizzato che anche al macello la presenza di suini ad elevata contaminazione possa causare un maggiore impatto sul livello di contaminazione delle carcasse (Nauta, 2013).

Scopo di questo lavoro è stato descrivere, da un punto di vista quantitativo, la contaminazione da *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali e nelle carcasse di suini macellati in due mattatoi del Centro Italia.

MATERIALE E METODI

Campionamento

L'indagine è stata svolta da Aprile a Novembre 2014 in due mattatoi dell'Italia centrale.

Il primo mattatoio (A) macellava circa 40 suini per ogni giornata di macellazione, e una sola volta alla settimana; inoltre, la provenienza dei suini era locale (allevamenti in un raggio di

circa 100 km) ed il macello era sprovvisto di stalle di sosta.

Il secondo mattatoio (B) macellava circa 2000 suini/die in due giornate alla settimana, la provenienza dei suini macellati era nazionale. Questo mattatoio era fornito di stalle di sosta.

La numerosità campionaria è stata calcolata per stimare la prevalenza di suini che presentavano una carica di *Salmonella* spp. a livello ciecale maggiore o uguale a 1000 batteri/grammo per giornata di macellazione. Il numero di animali campionati è stato rappresentativo del numero dei suini macellati nel corso della giornata in cui si è effettuato il campionamento. Si è considerato un livello di confidenza del 95%, tenendo conto di una prevalenza attesa del 12% e una precisione del 10 %. Il livello di prevalenza attesa è stato calcolato sulla base degli esiti di un progetto pilota.

Presso l'ambiente di macellazione, per ogni giornata di macellazione, sono stati effettuati dei campioni ambientali prima dell'introduzione degli animali. Il prelievo è stato effettuato con spugne pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Spongebags, Solar Biologicals Inc), eseguendo il campionamento da almeno otto diversi punti lungo la catena di macellazione (vasche di scottatura, scivolo carcasse, coltelli inizio pedana, carrelli porta visceri, ganci, due seghe ad acqua, coltelli fine pedana).

In ciascuna giornata di macellazione, i suini oggetto di prelievo sono stati selezionati mediante randomizzazione semplice. Per ciascun animale è stato effettuato un prelievo di contenuto ciecale e tamponi carcassa. Il campionamento della carcassa è avvenuto prima del lavaggio finale. Il prelievo è stato effettuato in base a quanto previsto dalla Norma UNI EN ISO 17604:2003/E, in cinque punti diversi (arto posteriore distale, coscia, addome laterale, regione media dorsale e addome mediale), per ciascuna mezzena, utilizzando una mascherina monouso e spugne pre-umidificate con acqua peptonata tamponata (Spongebags, Solar Biologicals Inc) per una superficie totale di 1000 cm² circa. Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti, successivamente, al laboratorio di analisi ed esaminati entro 24 ore.

Isolamento batterico

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata attraverso una tecnica miniaturizzata secondo la norma ISO/TS 6579-2:2012/A1, che fornisce un metodo per la numerazione di *Salmonella* spp. mediante calcolo del *most probable number* (MPN).

In breve, si è effettuata una prima semina di 5 grammi di contenuto ciecale in 45 ml di acqua peptonata tamponata (APT) e, a partire da questa, sono state effettuate altre diluizioni in base 5 sempre in APT. Tutte le diluizioni sono state effettuate in triplo ed incubate a 37°± 1 °C per 18 ore. I tamponi carcassa sono stati risospesi in 225 ml di APT e successivamente diluiti come sopra descritto.

Dopo l'incubazione le diluizioni sono state seminate su Modified Semisolid Rappaport Vassiliadis (Biokar Diagnostics), addizionato con novobiocina allo 0.01%, e incubate a 41,5°C per 24 - 48 ore. Crescite opache lontano dal sito di inoculo su MSRV sono state considerate sospette e di conseguenza seminate sul terreno solido selettivo Xylose Lysine Deoxycolate agar (Biolife) quindi incubate a 37 ° C per 24 ore. Le colonie tipiche sono state confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, bioMérieux) e sierologicamente (*Salmonella* test sera omnivalent/ polyvalent, Siemens).

Il calcolo del MPN del è stato effettuato in base a quanto descritto dalla norma ISO 7218:2007/E. È stata effettuata una categorizzazione dei campioni di contenuto ciecale e tampone carcassa in base ai risultati della prova. Il valore numerico è stato trasformato nel corrispondente logaritmo: i valori inferiori a 100 MPN/g/o spugna sono stati inclusi nella prima categoria (<2 log); nella seconda categoria (2 log) i valori compresi tra 2 e 2,99 log; nella terza categoria (3 log) i valori compresi tra 3 e 3,99 log e così per quelle successive.

I suini sono stati successivamente categorizzati sulla base della carica di *Salmonella* spp. rilevata a livello ciecale. Quando il valore di MPN ottenuto era pari o superiore a 1000, il suino veniva considerato come altamente contaminato.

Tipizzazione sierologica e test di sensibilità agli antimicrobici

La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. è stata eseguita secondo lo schema di Kauffmann-White-Le Minor (Popoff, 2003).

Il saggio di sensibilità agli antimicrobici è stato eseguito sugli isolati di *Salmonella* spp. tramite la tecnica della diffusione in agar secondo le linee guida CSLI (2002; 2007). Gli antimicrobici testati sono stati quelli del pannello Enter-net: Ampicillina (AMP 10 µg); Amoxicillina + Acido Clavulanico (AMC 30 µg); Ceftazidime (CAZ 30 µg); Cefotaxime (CTX 30 µg); Cefalotina (KF 30 µg); Ciprofloxacina (CIP 5 µg); Colistina solfato (CT 10 µg); Cloramfenicolo (C 30 µg); Gentamicina (CN 10 µg); Kanamicina (K 30 µg); Acido Nalidixico (NA 30 µg); Sulfamides (Su 300 µg); Streptomina (S 10 µg); Tetraciclina (Te 30 µg) e Trimethoprim + Sulfametossazolo (SXT 25 µg).

RISULTATI

Prevalenza di *Salmonella* spp. per mattatoio e tipologia di campione

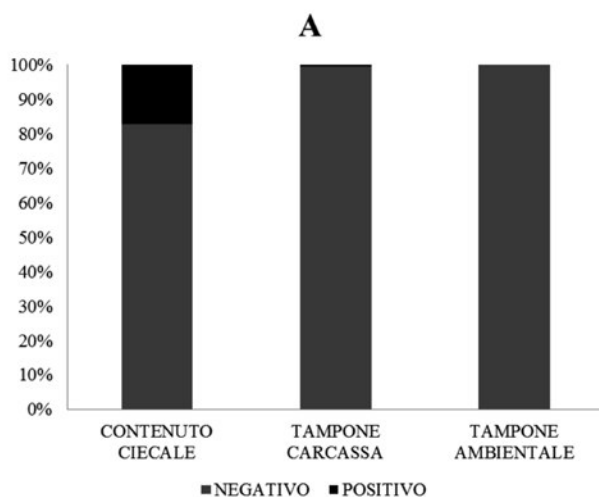
Nel mattatoio A sono state campionate 12 giornate, da aprile a dicembre 2014. Complessivamente, sono stati prelevati 708 campioni, di cui 300 campioni di contenuto ciecale, 300 tamponi carcassa e 108 campioni di tamponi ambientali.

La prevalenza di *Salmonella* spp. nei campioni di contenuto ciecale è risultata del 17,33% (IC95% 15%-20%), mentre nei tamponi carcassa dello 0,67% (IC95% 0,42%-1,46%) (Figura 1).

Tutti i tamponi ambientali (n=108) hanno dato esito negativo.

Figura 1: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni prelevati presso il mattatoio A, distinti per tipologia ed esito.

Figure 1: Bar chart showing the distribution of samples of different origin from slaughterhouse A, divided according to test results.



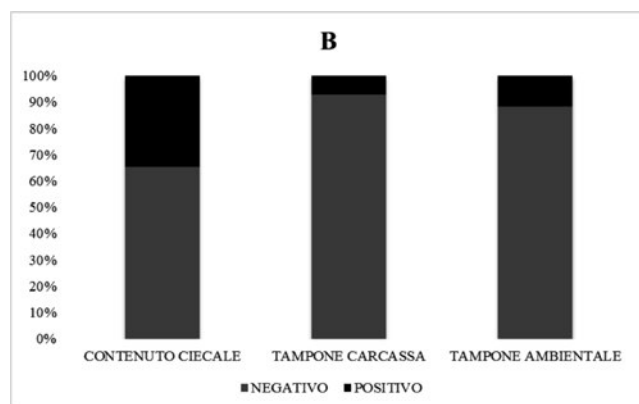
Nel mattatoio B sono state campionate 7 giornate, da aprile a dicembre 2014. In totale, sono stati prelevati 671 campioni: 306 campioni di contenuto ciecale, 306 tamponi carcassa e 59 tamponi ambientali.

La prevalenza di *Salmonella* spp. nel contenuto ciecale è stata del 34,64% (IC95% 29,37%-40,30%); quella dei campioni carcassa del 7,19% (IC95% 4,66%-10,84%) (Figura 2).

Complessivamente, 7 su 59 tamponi ambientali (11,9%) hanno fornito esito positivo per *Salmonella* spp.

Figura 2: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni prelevati presso il mattatoio B, distinti per tipologia ed esito.

Figure 2: Bar chart showing the distribution of samples of different origin from slaughterhouse B, divided according to test results.

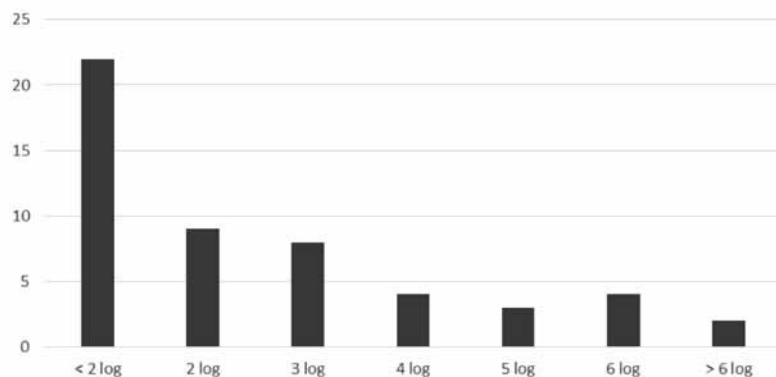


Prevalenza e distribuzione dei suini fortemente contaminati

La distribuzione dei suini sulla base della quantità di *Salmonella* spp. riscontrata a livello ciecale nel mattatoio A è illustrata in figura 3.

Figura 3: mattatoio A. Diagramma a barre che mostra la distribuzione dei campioni sulla base della quantità di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, espressa come logaritmo.

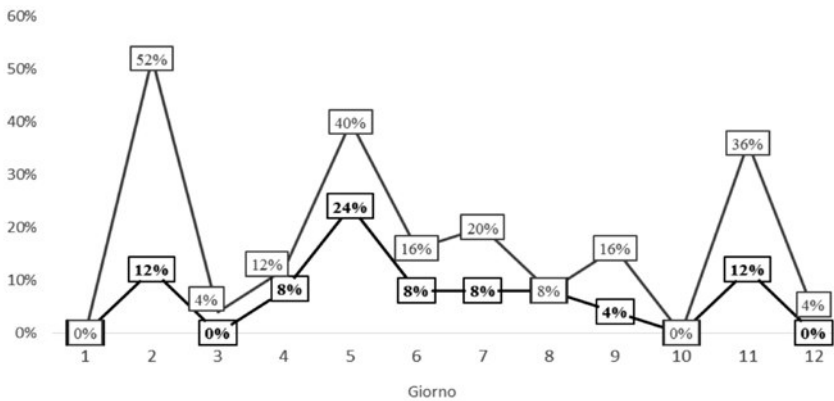
Figure 3: slaughterhouse A. Bar chart showing the distribution of samples according to the *Salmonella* spp. load in cecum, expressed as log.



La prevalenza di suini fortemente contaminati nel mattatoio A è stata del 7% (IC95% 4,49%-10,66%). L'andamento della prevalenza di suini risultati positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale e il valore di prevalenza di suini fortemente contaminati rilevati nella stessa giornata, è indicato in figura 4.

Figura 4 : mattatoio A. Prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale (linea grigio) e prevalenza di suini fortemente contaminati (linea nera) nelle diverse giornate di prelievo.

Figure 4: slaughterhouse A. The prevalence of *Salmonella* spp. positive pigs (cecal content, grey line) together with the prevalence of high-contaminated pigs (black line) on each sampling day are shown.

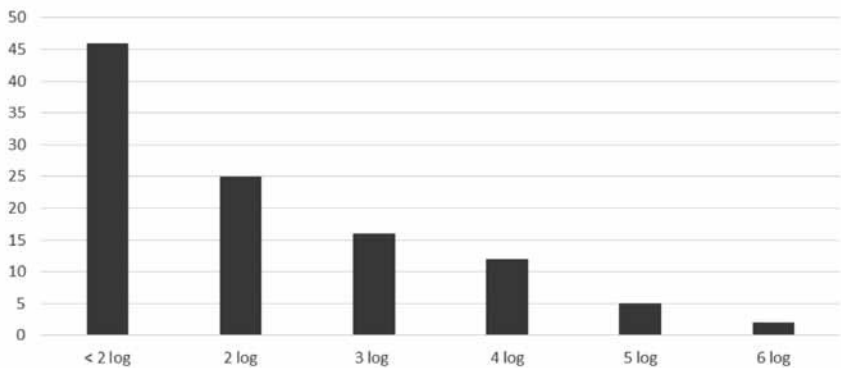


Solo due campioni di tampone carcassa sono risultati positivi nel mattatoio A, con una carica microbica < 2 log.

La distribuzione dei suini sulla base della quantità di *Salmonella* spp. riscontrata a livello ciecale nel mattatoio B è illustrata in figura 5.

Figura 5: mattatoio B. Diagramma a barre che mostra la distribuzione dei campioni sulla base della quantità di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, espressa come logaritmo.

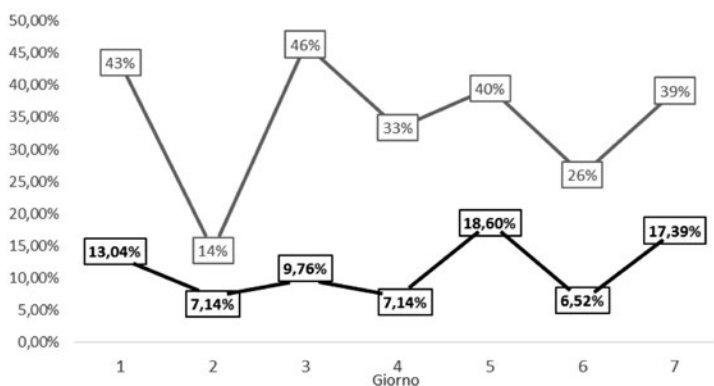
Figure 5: slaughterhouse B. Bar chart showing the distribution of samples according to the *Salmonella* spp. load in cecum, expressed as log.



La prevalenza di suini fortemente contaminati nel mattatoio B si è collocata al 11,44% (IC95% 8,20%-15,67%). L'andamento della prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale e di suini fortemente contaminati, distinto per giornata di macellazione, nel mattatoio B, è evidenziata nella figura 6.

Figura 6: mattatoio A. Prevalenza di suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale (linea grigio) e prevalenza di suini fortemente contaminati (linea nera) nelle diverse giornate di prelievo.

Figure 6: slaughterhouse A. The prevalence of *Salmonella* spp. positive pigs (cecal content-grey line) together with the prevalence of high-contaminated pigs (black line) on each sampling day are shown.

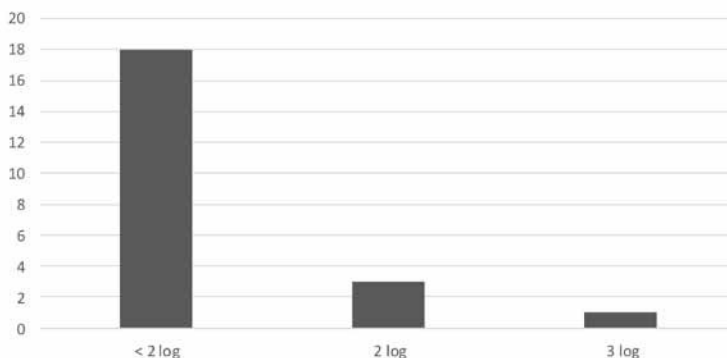


I risultati relativi alla contaminazione delle carcasse nel mattatoio B sono illustrati nelle figure 7 e 8.

Solo un tampone carcassa, prelevato nella seconda giornata di macellazione, ha presentato un valore pari a 3 log.

Figura 7: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei campioni carcassa prelevati presso il mattatoio B, distinti in base alla carica di *Salmonella* spp, espressa come logaritmo.

Figure 7: Bar chart showing the distribution of carcass swabs from slaughterhouse B, divided according to *Salmonella* spp. load, expressed as a logarithm.



Analisi per tipizzazione batterica e giornata di macellazione

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio A da contenuto ciecale sono indicate in tabella 1. Complessivamente, sono stati tipizzati 52 ceppi batterici: il 54% era rappresentato da *Salmonella* Derby; il 23% da *Salmonella* Rissen, il 21% dalla variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e infine il 2% da *Salmonella* Livingstone (tabella 1). I due ceppi provenienti da tamponi carcassa positivi nelle giornate 7 e 9 sono stati rispettivamente attribuiti a variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e *Salmonella* Derby.

Tabella 1: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da contenuto ciecale nel mattatoio A, per giorno di macellazione.

Table 1: slaughterhouse A: *Salmonella* spp. isolates from cecal contents, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.

MATTATOIO A	Risultato tipizzazione				Totale
	S. Derby	S. Livingstone	S. Rissen	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1					0
Giorno 2		1	12		13
Giorno 3				1	1
Giorno 4	1			2	3
Giorno 5	10				10
Giorno 6	4				4
Giorno 7				5	5
Giorno 8				2	2
Giorno 9	4				4
Giorno 10					0
Giorno 11	8			1	9
Giorno 12	1				1
Totale	28 (54%)	1 (2%)	12 (23%)	11 (21%)	52 (100%)

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio B da contenuto ciecale sono indicate in tabella 2. In questo mattatoio, la maggior parte dei ceppi è stata ricondotta a variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), al quale sierotipo corrispondeva il 36% del totale degli stipiti. Isolati appartenenti a questo sierotipo sono stati evidenziati in tutte le giornate di macellazione. Una percentuale simile, 27%, di isolati apparteneva invece a *Salmonella* Derby.

I risultati della tipizzazione degli isolati di *Salmonella* spp. nel mattatoio A da carcassa sono indicati in tabella 3. In questo caso, la maggior parte degli isolati (27%) apparteneva a *Salmonella* Rissen e *Salmonella* Panama.

Tabella 2: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da contenuto ciecale nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 2: slaughterhouse B: *Salmonella* spp. isolates from cecal contents, divided according to the belonging serotype and the day of sampling

MATTATOIO B		Risultato tipizzazione											Tot.
	S. Anatum	S. Derby	S. Enteritidis	S. Give	S. Goldcoast	S. Infantis	S. Livingstone	S. London	S. Panama	S. Rissen	S. Stanley	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1		6					1	2		4		7	20
Giorno 2					5							1	6
Giorno 3	2	4	1			5				2		5	19
Giorno 4		7								2		5	14
Giorno 5		2						3		4	2	6	17
Giorno 6		2		1					2	1		6	12
Giorno 7		8								2		8	18
Totale	2 (2%)	29 (27%)	1 (1%)	1 (1%)	5 (5%)	5 (5%)	1 (1%)	5 (5%)	2 (2%)	15 (13%)	2 (2%)	38 (36%)	106

Tabella 3: risultati della tipizzazione di ceppi isolati da tampone carcassa nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 3: slaughterhouse B: *Salmonella* spp. isolates from carcass swabs, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.

MATTATOIO B		Risultato Tipizzazione						Totale
	S. Derby	S. London	S. Rissen	S. Panama	S. Goldcoast	S. Infantis	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1	2	2	1					5
Giorno 2					1		1	2
Giorno 3			1			1		2
Giorno 4								0
Giorno 5	1		3	6			2	12
Giorno 6			1					1
Giorno 7								0
Totale	3(14%)	2(9%)	6(27%)	6(27%)	1(4,5%)	1(4,5%)	3(14%)	22

Per quanto riguarda gli isolati da tamponi ambientali questi sono stati ricondotti per 43% alla variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-), per il 29 % a *Salmonella* Derby e per il 14% da Rissen e Goldcoast (Tabella 4).

Tabella 4: risultati della tipizzazione di ceppi isolati dai tamponi ambientali nel mattatoio B per giorno di macellazione.

Table 4: *slaughterhouse B: Salmonella spp. isolates from environmental samples, divided according to the belonging serotype and the day of sampling.*

	MATTATOIO B				Totale
	S. Derby	S. Rissen	S. Goldcoast	S. 4,[5],12:i:-	
Giorno 1				1	1
Giorno 2			1	1	2
Giorno 3	1				1
Giorno 4		1			1
Giorno 5	1			1	2
Giorno 6					0
Giorno 7					0
Totale	2 (29%)	1(14%)	1(14%)	3(43%)	7(100%)

Analisi di antibiotico-resistenza

Il test di sensibilità agli antimicrobici è stato eseguito su tutti i ceppi risultati positivi (182) per *Salmonella* spp. (Tabella 5)

Tabella 5: risultati della valutazione della sensibilità agli antimicrobici, divisi per sierotipo. Sono riportati tutti i sierotipi isolati in almeno due occasioni.

Table 5: antimicrobial susceptibility of the *Salmonella* spp. serovars. Only the serovars isolated at least two times are shown.

Sierotipo	Totale	Sensibili (%)	Numero e percentuali di isolati resistenti a Tetraciclina (Te), Ampicillina (AMP), Streptomicina (S), Sulfonamidi (Su), Sulfametossazolo (SXT), Acido nalidixico (NA) e Cloramfenicolo (C)						
			Te (%)	AMP (%)	S (%)	Su (%)	SXT (%)	NA (%)	C (%)
S. Derby	61	27 (44)	31 (51)	1 (2)	2 (3)	2 (3)	-	-	-
S. 4,[5],12:i:-	53	1 (2)	44 (83)	50 (94)	48 (90)	48 (90)	8 (15)	-	-
S. Rissen	33	15 (46)	9 (27)	2 (6)	-	-	-	6 (18)	1 (3)
S. Panama	8	7 (88)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	1 (12)	-	-
S. London	7	4 (57)	-	-	-	3 (43)	-	-	-
S. Goldcoast	6	6 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Infantis	6	6 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Anatum	2	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Livingstone	2	2 (100)	-	-	-	-	-	-	-
S. Stanley	2	-	-	-	-	-	-	2 (100)	-

Dei trentuno isolati di *S. Derby* resistenti a Tetraciclina, dieci presentavano il resistotipo SSuT, due il resistotipo ASSuT+SXT ed uno ASuT.

La maggior parte (75%) degli isolati di variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) presentava un resistotipo ASSuT, e di questi otto isolati erano anche resistenti a SXT. Inoltre, un isolato di *S. Typhimurium* (4,12,i:-) ASSuT presentava resistenze anche per Amoxicillina e acido clavulanico, Cefalessina, Ceftriaxone, Ceftadizime e Gentamicina. Un isolato di *S. Panama* ha mostrato a un resistotipo ASSuT-SXT.

Infine, gli unici due isolati di *S. Enteritidis* e di *S. Give*, erano sensibili a tutti gli antimicrobici saggiati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I livelli di prevalenza di *Salmonella* spp. nei contenuti ciecali rilevati nel presente lavoro indicano valori vicini a quelli riportati in letteratura (Bonardi nel 2003; Bonardi, 2013). Per quanto riguarda i livelli di contaminazione delle carcasse, questi si collocavano per il mattatoio B a valori di prevalenza simili a quelli riportati dall'EFSA nel 2008 e da Bonardi nel 2013, mentre il mattatoio A ha presentato valori di contaminazioni molto più contenuti.

Il livello di contaminazione da *Salmonella* spp. nel suino dipende non solo dall'allevamento di provenienza, ma anche dalla durata del trasporto e dall'eventuale periodo trascorso nelle stalle di sosta: entrambe queste fasi costituiscono infatti una fonte di stress per gli animali e una possibilità di trasmissione dell'infezione (Magistrali, 2008; Boughton, 2007; Rostagno et al., 2003). In letteratura, il numero di suini macellato per giornata, è risultato essere correlato con il rischio che i suini albergassero *Salmonella* spp. a livello linfonodale (Marier, 2014).

I suini portatori possono quindi contaminare l'ambiente di macellazione in diversi modi: attraverso la fase di depilazione e pulizia delle carcasse le feci possono infatti arrivare alla superficie delle stesse; inoltre, durante le fasi di eviscerazione si può osservare una perdita di contenuto intestinale. *Salmonella* spp. può quindi contaminare la stessa carcassa, altre carcasse macellate nella medesima giornata (cross contaminazione) o l'ambiente. Nell'ambiente di macellazione, *Salmonella* spp. può divenire parte della flora residente, anche per la difficoltà di decontaminare in modo efficace le attrezzature (Smid, 2014).

La differenza da noi osservata tra i due mattatoi può quindi dipendere da numerosi fattori, tra cui il livello di contaminazione degli animali in entrata, la provenienza dei suini, l'assenza di stalle di sosta e la contaminazione residuale delle strutture a inizio macellazione. Un dato analogo è stato per altro riscontrato anche nel corso di un nostro precedente lavoro (D'Avino, 2014).

Nel corso del presente lavoro, un diverso livello di contaminazione delle strutture è stato descritto nei due mattatoi, infatti mentre nel mattatoio A nessun tampone ambientale ha dato esito positivo per *Salmonella* spp., nel mattatoio B sono stati riscontrati livelli di contaminazioni prossimi al 12%. Inoltre, è stato possibile isolare nella stessa giornata di macellazione lo stesso sierotipo da tamponi ambientali e da carcasse, sottolineando l'importanza della contaminazione di origine ambientale (van Hoek, 2012; Gomes-Neves, 2014).

Un'indagine EFSA (2008) indica i sierotipi isolati nei due mattatoi, *S. Derby*, S.4,[5],12:i:- e *S. Rissen*, come tra i cinque più frequenti nei suini italiani, dato confermato anche da Bonardi (2013), che ha riportato i sierotipi Derby, variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) e Rissen come quelli prevalenti a livello ciecale nel corso della sua indagine. Nel corso del nostro studio, più del 80% degli isolati è stato ricondotto a *S. Derby* e variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) o *S. Rissen*. Inoltre, la maggior parte degli isolati di variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4,[5],12:i:-) (75%) si sono dimostrati appartenenti al resistotipo ASSuT. Tale resistotipo è stato segnalato negli ultimi dieci anni in Europa, sia in casi di infezione da *Salmonella* spp. nell'uomo, sia nei suini e nella carne suina (Hopkins, 2010) ed è considerato una variante di *S. Typhimurium* di particolare interesse da un punto di vista della sanità pubblica.

Considerando la distribuzione dei sierotipi nelle diverse giornate di macellazione, è possibile osservare come i sierotipi più frequenti siano stati riscontrati in più giornate di macellazione ed in diverse matrici, mentre i sierotipi meno frequenti hanno mostrato una distribuzione meno omogenea.

Per quanto riguarda i dati relativi alla carica di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale, la maggior parte dei campioni risultati positivi aveva un livello di contaminazione pari o inferiore

a 2 log/g. In letteratura, sono disponibili pochi dati quantitativi di contaminazione da *Salmonella* spp. al macello, inoltre la maggior parte di questi si riferiscono a valori di prevalenza molto più contenuti (Nauta, 2013; van Hoek, 2012). In un recente lavoro condotto in Danimarca, solo il 2,6% dei contenuti ciecali era positivo e solo lo 0,18% superava le 670 UFC (Nauta, 2013). Nel presente lavoro, in entrambi i mattatoi, è stato possibile descrivere la presenza di suini fortemente contaminati, stimata del 7 % nel macello A e dell'11,44% nel mattatoio B, con livelli di prevalenza simili a quelli attesi, sulla base dell'esito di un lavoro pilota.

Per quanto riguarda i dati quantitativi di contaminazione per *Salmonella* spp. delle carcasse, questi sono risultati generalmente bassi, inferiori a 2 log/1000cm² di superficie; inoltre, è necessario considerare che questa carica si riferisce ad un prelievo effettuato prima dell'ultimo lavaggio.

In conclusione, nel corso del presente lavoro la prevalenza di *Salmonella* spp. a livello ciecale, di tamponi carcassa e di tamponi ambientali, è stata molto diversa nei due mattatoi campionati, confermando quanto già segnalato in letteratura sulla variabilità della contaminazione da *Salmonella* in base al mattatoio (Arguello, 2013).

I suini hanno presentato differenti livelli di contaminazione ciecale da *Salmonella* spp., generalmente collocati al di sotto di 100 ufc/g. Tuttavia, è stato possibile descrivere una prevalenza non trascurabile di suini fortemente contaminati.

BIBLIOGRAFIA

Anonymous. EN ISO 17604:2003/E “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis” ISO 17604:2003/E

Anonymous. EN ISO 6579-2:2012/A1. “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage” ISO/TS 6579-2:2012(E)

Anonymous. EN ISO 7218:2007/E. “Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations” ISO 7218:2007(E)

Arguello H1, Alvarez-Ordóñez A, Carvajal A, Rubio P, Prieto M.(2013). “Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production.” *Journal of Food Protection*, 2013 May;76(5):899-911.

Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., S’Incau M., Liebana E., Morabido S. (2003) “Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy” *International Journal of Food Microbiology*, 2003 Aug 15;85(1-2):101-10.

Bonardi S, Bassi L, Brindani F, D’Incau M, Barco L, Carra E, Pongolini S. (2013) “Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy.” *International Journal of Food Microbiology*, 2013 May 15;163(2-3):248-57

Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N. (2007) “Quantitative examination of *Salmonella* spp. in the lairage environment of a pig abattoir”. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4(1):26-32

Clinical and Laboratory Standards Institute (2002). “Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard—NCCLS document M31-A2” Vol. 22 No. 6, 2nd ed. (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). “Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement—NCCLS document M100-S17” Vol. 27 No. 1. (ISBN 1-56238-461-9). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA.

D’Avino N, Cucco L, Betti Sorbelli V, Ciuti F, Ortenzi R, Panicià M, Staffolani M, Pezzotti G, Magistrali C F (2014) “Diffusione di *Salmonella* spp. lungo la filiera produttiva suina in Italia centrale” *Large Animal Review*, 2014, 20, 157-163

European Food Safety Authority, 2006. “Opinion of the Scientific Panel on Biological Hazards on Risk assessment and mitigation options of *Salmonella* in pig production.” *The EFSA Journal* 341, 1–131. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/efsajournal/pub/341.htm>

European Food Safety Authority, 2015. “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013.” *The EFSA Journal* 2015;13(1):3991. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/doc/3991.pdf>

European Food Safety Authority, (2008). “Quantitative Microbiological Risk Assessment on *Salmonella* in Slaughter and Breeder pigs: Final Report.” Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/46e.htm>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2008) “Report of the task force on zoonosis data collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs. Part A.” *The EFSA Journal*, 135: 1-111. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/scdocs/doc/1377.pdf>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2012) “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010”. *The EFSA Journal* 10, 2597. Available online at: <http://www.efsa.europa.eu/it/search/doc/2597.pdf>

European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control 2014. “The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food- borne Outbreaks in 2012.” *The EFSA Journal* 2014;12(2):3547. Available online at: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>

Gomes-Neves E., Antunes P., Manageiro V., Gärtner F., Caniça M., da Costa J.M., Peixe L. (2014) “Clinically relevant multidrug resistant *Salmonella enterica* in swine and meat handlers at the abattoir” *Veterinary Microbiology*, 2014 Jan 10; 168 (1):229-33.

Hopkins K.L., Kirchner m., Gueraa B., Granier S.A., Lucarelli C., Porrero M.C., Jakubczack

A., Threlfall E.J., Mevius D.J. (2010) "Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4, (5), 12:i- in Europe: a new pandemic strain?" *Eurosurveillance* 15 (22). Available online at: <http://www.eurosurveillance.org>.

Krämer N1, Löfström C, Vigre H, Hoorfar J, Bunge C, Malorny B. (2011) "A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses". *International Journal of Food Microbiology*, 2011 Mar 1;145 Suppl 1:S86-95.

Magistrali C., Dionisi A.M., de Curtis P., Cucco L., Vischi O., Scuota S., Zicavo A., Pezzotti G. (2008) "Contamination of *Salmonella* in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse." *Research in Veterinary Science*, 85: 204-207.

Marier E.A., Snow L.C., Floyd T., McLaren I.M., Bianchini J., Cook A.J., Davies R.H. (2014). "Abattoir based survey of *Salmonella* in finishing pigs in the United Kingdom 2006-2007." *Preventive Veterinary Medicine*, 1;117(3-4):542-53.

Nauta M., Barfod K., Hald T., Sorensen A.S., Emborg H. D., Aabo S. (2013) Prediction of *Salmonella* carcass contamination by a comparative quantitative analysis of *E. coli* and *Salmonella* during pig slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 166: 231-237.

Pires A.F.A., Funk J.A., Lim A., Bolin S.R. (2013) "Enumeration of *Salmonella* in feces of naturally infected pigs." *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11):933-7

Pires S.M., de Knecht L., Hald T. (2012) "Estimation of the relative contribution of different food and animal sources to human *Salmonella* infections in the European Union." EFSA-Q-2010-00685. Supporting publications, <http://www.efsa.europa.eu>.

Popoff M.Y., Bockenmuhl J., Gheesling L.L. (2003) supplement 2001 (no 45) to the Kauffmann-White Scheme. *Research in Microbiology*, 154: 173-174.

Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. (2003) "Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with *Salmonella enterica*". *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8):4489-94.

Smid JH, van Hoek AH, Aarts HJ, Havelaar AH, Heres L, de Jonge R, Pielaat A. (2014). "Quantifying the sources of *Salmonella* on dressed carcasses of pigs based on serovar distribution." *Meat Science - Journal* 96(4):1425-31

van Hoek AH, de Jonge R, van Overbeek WM, Bouw E, Pielaat A, Smid JH, Malorny B, Junker E, Löfström C, Pedersen K, Aarts HJ, Heres L. (2012) "A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of *Salmonella* spp. in a pork slaughter-line". *International Journal of Food Microbiology*, 153(1-2):45-52

LA CONTAMINAZIONE DA *SALMONELLA* DELLE CARCASSE DI SUINI MACELLATI È CORRELATA AL QUANTITATIVO DI *SALMONELLA* PRESENTE A LIVELLO CIECALE

THE SALMONELLA CONTAMINATION OF SWINE CARCASSES AT SLAUGHTER IS RELATED TO THE AMOUNT OF SALMONELLA RECOVERED IN CECUM

DE LUCA S., CUCCO L., MASSACCI F.R., MARESCA C., PANICCIÀ M.,
SCOCCIA E., STAFFOLANI M. PEZZOTTI G., MAGISTRALI C.F.,

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

Parole chiave: *Salmonella*, suini, contaminazione, carica

Key words: *Salmonella*, swine, contamination, load

Riassunto

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare se il quantitativo di *Salmonella* spp. presente a livello ciecale in suini macellati sia correlato alla contaminazione delle carcasse. Il lavoro è stato condotto in un mattatoio del Centro Italia, e il campionamento è stato calcolato per essere rappresentativo dei suini macellati in una giornata, sulla base di una prevalenza attesa di suini fortemente contaminati (SFC, carica ≥ 3 log/g) del 12%, come indicato da uno studio pilota. Le giornate sono state suddivise in 'alta ($\geq 36\%$) o bassa ($< 36\%$) prevalenza' sulla base dei suini positivi per *Salmonella* spp. a livello ciecale e in 'alta ($\geq 10\%$) o bassa ($< 10\%$) carica', a seconda della prevalenza di suini SFC. L'analisi statistica ha permesso di stabilire una correlazione tra il livello di contaminazione della carcasse e la carica di *Salmonella* a livello ciecale dello stesso animale (coefficiente di correlazione di Spearman : 0,2254; p-value=0,0001). Non è stata osservata correlazione tra il livello di contaminazione delle carcasse e la categorizzazione in 'alta prevalenza' della giornata di macellazione, mentre la stessa è stata rilevata con la categorizzazione 'ad alta carica' (p=0,0011). Infine, non si è osservata una correlazione tra il livello di contaminazione ciecale e il sierotipo di *Salmonella* isolato. In conclusione, in questo lavoro la carica di *Salmonella*, e non la prevalenza di suini positivi a livello ciecale, è stata associata al livello di contaminazione delle carcasse.

Abstract

The aim of this study was to examine the relationship between the amount of *Salmonella* spp in cecal contents and the carcass contamination at slaughter. The study was carried out in a slaughterhouse in Central Italy, and the sampling scheme was designed to be representative of the pigs slaughtered in a day. The expected prevalence of high-contaminated swine (HCS, load ≥ 3 log/g) was 12%, based on the results of a pilot study. The sampling days were classified as 'high or low prevalence' days, depending on the proportion of cecal contents resulted positive for *Salmonella* spp. and in 'high and low load' depending on the prevalence of HCS. Statistical analysis revealed a correlation between the contamination level of carcasses and the cecal *Salmonella* loads of the same animal (Spearman' correlation coefficient: 0,2254; p-value=0,0001). No correlation was found between the contamination of carcasses and the categorization of the day of sampling as 'high prevalence day'. Conversely, a correlation was found between the contamination of carcasses and the 'high load' category of the sampling day (p=0,0011). No correlation was shown between the amount of the *Salmonella* spp. recovered in cecum and the belonging serotype. In this study, the *Salmonella* load in cecum and not the prevalence of *Salmonella* positive caeca, was correlated to the contamination of carcasses.

INTRODUZIONE

Con 92916 casi registrati in tutta Europa, di cui 1453 in Italia, la salmonellosi si è confermata essere una delle più importanti tossinfezioni di origine alimentare (EFSA, 2014). La carne suina e i prodotti derivati sono considerati tra le principali fonti di salmonellosi umana (Hald *et al.*, 2003).

La presenza di *Salmonella* spp. sulle carcasse e nelle carni suine è associata a fenomeni di contaminazione e di cross-contaminazione che avvengono durante la macellazione (Nauta *et al.* 2013). I fattori di rischio legati a tale evento sono tuttavia diversi, creando un quadro complesso in cui non è facile riconoscere il ruolo svolto da ogni singolo fattore. La contaminazione delle carcasse, infatti, dipende dallo stato sanitario dei suini durante l'ingrasso (Duggan *et al.*, 2010), dall'allevamento di provenienza, ma anche dalla durata del trasporto e dall'eventuale periodo trascorso nelle stalle di sosta. Queste ultime costituiscono infatti una fonte di stress per gli animali e una possibilità di trasmissione dell'infezione (Rostagno *et al.*, 2003; O'Connor *et al.*, 2006; Boughton *et al.*, 2007; Magistrali *et al.*, 2008).

I suini portatori possono quindi contaminare l'ambiente di macellazione; *Salmonella* spp. può infatti contaminare la stessa carcassa, altre carcasse macellate nella medesima giornata (cross contaminazione) o l'ambiente. Nell'ambiente di macellazione, *Salmonella* spp. può divenire parte della flora residente, anche contaminando le attrezzature automatiche dove può persistere, (van Hoek *et al.*, 2012) anche per la difficoltà di effettuare una efficace decontaminazione (Smid *et al.*, 2014).

Come già affermato, lo stato sanitario dei suini è importante in quanto i suini portatori asintomatici rappresentano una fonte costante di *Salmonella* per tutta la catena produttiva (Boyen *et al.*, 2008). La maggior parte dei lavori finora condotti si limitano prevalentemente a valutazioni di tipo qualitativo e sono pochi quelli in cui vengono raccolti ed esaminati dati di tipo quantitativo, inoltre alcuni di questi sono riferiti a realtà in cui le prevalenze di *Salmonella* sono molto diverse da quelle italiane. Ad esempio, in uno studio realizzato da van Hoek *et al.* (2012) sono stati raccolti dati quantitativi a partire da tamponi rettali e il numero medio di *Salmonella* era $1,88 \pm 1,42 \log g^{-1}$. In un recente lavoro condotto in Danimarca, solo il 2,6% dei contenuti ciecali era positivo e solo lo 0,18% superava le 670 UFC (Nauta, 2013). Tuttavia, una corretta stima del rischio correlato alla contaminazione da *Salmonella* necessita di dati di carattere quantitativo, in quanto tale rischio non è legato solamente alla presenza/assenza del batterio, ma anche alla carica batterica associata (Pires *et al.*, 2013).

Scopo del seguente lavoro è stato di valutare una possibile correlazione tra la carica di *Salmonella* spp. riscontrata a livello ciecale e quella presente a livello di carcasse. Per valutare l'impatto dei fenomeni di cross-contaminazione, sono stati anche presi in esame i valori riferiti ad ogni giornata di macellazione.

MATERIALE E METODI

Campionamento

L'indagine è stata svolta da Aprile a Novembre 2014 in un mattatoio del centro Italia a cui afferivano suini provenienti dall'intero territorio nazionale.

La numerosità campionaria è stata calcolata per stimare la prevalenza di suini che presentavano una carica di *Salmonella* a livello ciecale maggiore o uguale a 1000 batteri/grammo (suini fortemente contaminati, 'SFC') per giornata di macellazione. Il numero di animali campionati è stato rappresentativo del numero dei suini macellati nel corso della giornata in cui si è effettuato il campionamento. Si è considerato un livello di confidenza (L.C.) del 95%, tenendo in considerazione una prevalenza attesa del 12% di SFC e una precisione considerata del 10%. Il livello di prevalenza attesa è stato calcolato sulla base degli esiti di un progetto pilota. Presso l'ambiente di macellazione, per ogni giornata di macellazione, sono stati prelevati dei campioni

ambientali prima dell'introduzione degli animali.

In ciascuna giornata di macellazione, i suini oggetto di prelievo sono stati selezionati mediante randomizzazione semplice. Per ciascun animale è stato effettuato contemporaneamente sia un prelievo di contenuto ciecale che un tampone della carcassa.

Il campionamento della carcassa è avvenuto in ogni caso prima del lavaggio finale. Il prelievo è stato effettuato in base a quanto previsto dalla Norma UNI EN ISO 17604:2003/E, in cinque punti diversi (arto posteriore distale, coscia, addome laterale-pancetta, regione media dorsale e addome mediale), per ciascuna mezzena, utilizzando una mascherina monouso, per una superficie totale di 1000 cm² circa.

Sulla base degli esiti analitici della contaminazione ciecale, i suini sono stati suddivisi in due categorie, ad alta (MPN ≥ 1000) e a bassa contaminazione (MPN < 1000).

Quindi, le giornate di macellazione sono state categorizzate in base alla prevalenza di suini ad alta contaminazione, in giornate a bassa prevalenza ($< 10\%$) e ad alta prevalenza ($> 10\%$).

Infine, le giornate di macellazione sono state categorizzate anche sulla base del numero complessivo di suini che presentavano un contenuto ciecale positivo per *Salmonella*, in questo caso il livello di prevalenza soglia è stato fissato al 36%, sulla base di un dato bibliografico (Bonardi *et al.*, 2003).

Isolamento batterico

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata attraverso una tecnica miniaturizzata secondo le norme ISO/TS 6579-2:2012/A1 che fornisce un metodo per la numerazione di *Salmonella* spp. mediante calcolo del *most probable number* (MPN).

Le colonie sospette sono state confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, bioMérieux) e sierologicamente (*Salmonella* test sera omnivalent/ polyvalent, Siemens).

Il calcolo dell'MPN è stato effettuato in base a quanto descritto dalla norma ISO 7218:2007/E.

Tipizzazione sierologica

La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. è stata eseguita secondo lo schema di Kauffmann-White-Le Minor (Popoff, 2003).

Analisi statistica

Sono stati esclusi dall'analisi statistica gli isolati da contenuto ciecale (N=5) e da carcassa (N=5), afferenti a 2 giornate di macellazione su 7 totali, i quali presentavano lo stesso sierotipo rinvenuto a livello ambientale. L'analisi statistica è stata effettuata per 4 obiettivi, elencati dalla lettera A alla lettera D:

A) verificare l'esistenza di una correlazione tra la carica di *Salmonella* presente a livello ciecale e la carica riscontrata sulle carcasse corrispondenti. Tali dati sono stati analizzati tramite l'indice di correlazione R per ranghi di Spearman.

B) verificare possibili differenze in termini di contaminazione delle carcasse tra giornate a bassa ed alta carica di suini fortemente contaminati ($\geq 3 \log/g$). I dati sono stati analizzati tramite test di Wilcoxon.

C) verificare possibili differenze in termini di contaminazione delle carcasse, tra giornate a bassa ed alta prevalenza. I dati sono stati analizzati tramite il chi-quadrato di Pearson, e la forza dell'associazione è stata valutata tramite l'Odds Ratio (OR).

D) verificare una possibile correlazione tra i sierotipi e il valore MPN delle feci. Sono stati utilizzati l'ANOVA ad un fattore e il test di Bonferroni per valutare le differenze tra sierotipi ed il test di Wilcoxon, per valutare la frequenza dei sierotipi, classificandoli in alta ($> 10\%$) e bassa ($< 10\%$) frequenza.

Per tutti i test statistici è stato posto un livello di significatività pari a $p \leq 0,05$.

RISULTATI

Al fine di escludere i campioni in cui la presenza di *Salmonella* sulla carcassa fosse riferibile a contaminazione ambientale, sono stati eliminati 10 campioni positivi in cui l'esito della sierotipizzazione indicava uno stesso sierotipo riscontrato nella medesima giornata a livello ambientale.

I campioni totali risultati analizzati sono stati 602 di cui 301 erano i campioni di contenuto ciecale, 103 dei quali positivi, pari al 34,2%, e 301 erano i campioni di tamponi carcassa di cui 17 positivi, pari al 5,64. Infine, erano 59 i tamponi ambientali, 7 dei quali positivi, pari al 8,8% (tabella 1).

Tabella 1: Esito dell'esame batteriologico per *Salmonella* spp. nelle diverse matrici esaminate. Tra parentesi, il valore percentuale.

Table 1: Overview of results from carcasses, cecal contents and environmental swabs, divided according to test results (%).

MATRICE	NEGATIVI	POSITIVI	TOTALE
CONTENUTO CIECALE	198 (65,8)	103 (34,2)	301 (100)
TAMPONE CARCASSA	284 (94,4)	17 (5,6)	301 (100)
TAMPONE AMBIENTALE	52 (91,2)	7 (8,8)	59 (100)

L'analisi dei dati inerenti il primo obiettivo, ovvero valutare l'eventuale correlazione tra la presenza di *Salmonella* a livello ciecale e la corrispettiva contaminazione della carcassa, ha inizialmente previsto l'utilizzo del test di Shapiro-Wilk al fine di individuare il tipo di distribuzione dei dati. La distribuzione non è risultata essere normale e la correlazione è stata effettuata tramite l'indice di correlazione R di Spearman. Considerando tutti i campioni (n.301), sia negativi che positivi, il coefficiente di correlazione di Spearman è risultato essere pari a 0,2254 con il relativo p-value significativo, pari a 0,0001, indicando così che c'è una correlazione, anche se debole, e che i valori dei contenuti ciecali e delle carcasse non sono indipendenti. La correlazione è risultata essere significativa anche valutando solo i campioni positivi (n.103), con un p-value pari a 0,0119 ed un coefficiente di 0,2470. E' dunque possibile concludere che la presenza di *Salmonella* a livello ciecale ha un effetto diretto sulla contaminazione delle carcasse. Il test di Shapiro-Wilk è stato utilizzato anche per verificare la distribuzione dei dati inerenti il secondo obiettivo, che prevedeva di valutare l'esistenza di una possibile correlazione in termini di contaminazione delle carcasse tra le diverse giornate di macellazione, divise tra giornate ad 'alta (>10%) e bassa (<10%) carica' prendendo in esame unicamente i suini positivi fortemente contaminati, (SFC= $\geq 3 \log/g$); anche in questo caso i dati non si distribuivano normalmente ed è stato utilizzato il test di Wilcoxon considerando significativo un p-value $\leq 0,05$.

La categorizzazione dei giorni ha individuato 3 giornate ad alta carica e 4 a bassa carica. Ed i corrispettivi valori di MPN sono stati utilizzati per effettuare l'analisi univariata. Sono state effettuate due analisi ed entrambe sono risultate essere significative: nella prima sono state considerate tutte le carcasse sia negative che positive (p=0,0011), invece nella seconda solo i campioni positivi (p=0,0209) (tabella 2). E' quindi possibile concludere che la prevalenza di suini ad alta contaminazione influenza la presenza di *Salmonella* sulle carcasse.

Tabella 2: Distribuzione dei campioni in base ai risultati nelle giornate di macellazione ad alta e bassa carica. Tra parentesi il valore percentuale.

Table 2: Distribution of samples from ‘high load’ and ‘low load’ days of slaughter (%).

Categoria della giornata	Tamponi carcassa: esito ricerca <i>Salmonella</i>		
	POSITIVI	NEGATIVI	TOTALE
ALTA CARICA	14 (10,6)	118 (89,4)	132 (100)
BASSA CARICA	3 (1,77)	166 (98,23)	169 (100)

L’analisi dei dati legati al terzo obiettivo, in seguito alla categorizzazione delle giornate di macellazione ad alta ($\geq 36\%$) e bassa ($< 36\%$) prevalenza tenendo in considerazione tutti i suini positivi per *Salmonella* a livello ciecale (tabella 3), ha previsto l’utilizzo del chi-quadrato di Pearson ($p\text{-value} \leq 0,05$) come test statistico per valutare le differenze tra le due categorie. In questo caso è risultato che non vi era alcuna differenza tra le giornate di macellazione ($p=0,7970$), inoltre l’OR risulta essere pari a 0,88 (IC95%:0,28-2,64).

Tabella 3: Distribuzione dei campioni in base ai risultati nelle giornate ad alta e bassa prevalenza. Tra parentesi il valore percentuale.

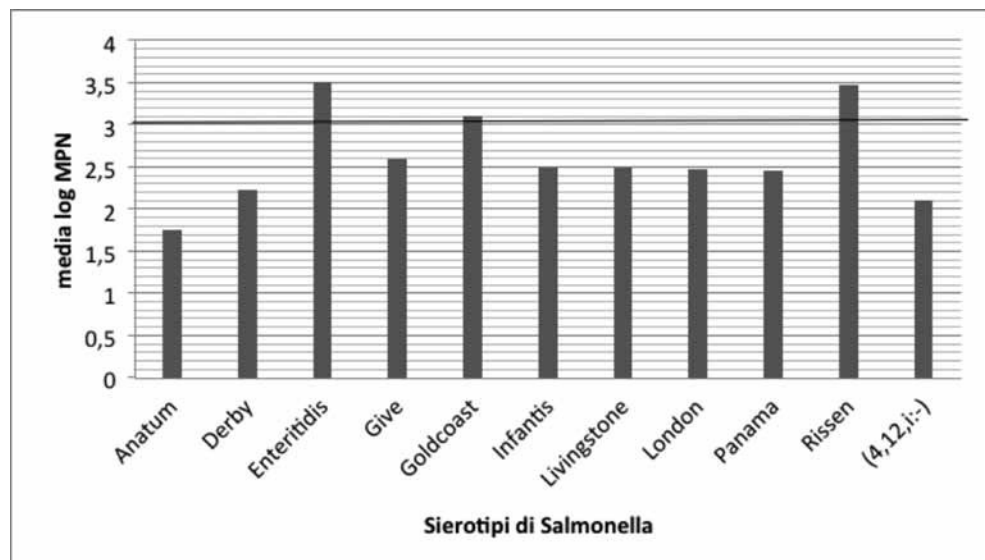
Table 3: Distribution of samples based on test results in ‘high prevalence’ and ‘low prevalence’ days (%).

Categoria della giornata	Tamponi carcassa: esito ricerca <i>Salmonella</i>		
	POSITIVI	NEGATIVI	TOTALE
ALTA PREVALENZA	7 (5,26)	126 (94,74)	133 (100)
BASSA PREVALENZA	10 (5,95)	158 (94,05)	168 (100)

I dati legati al quarto obiettivo sono stati esaminati tramite due analisi differenti: al fine di valutare le differenze tra i sierotipi di *Salmonella*, è stata effettuata un’analisi mediante ANOVA ad un fattore e con il test di Bonferroni è stato verificato quali fossero i gruppi interessati, mentre, per determinare se ci fosse una differenza statisticamente significativa tra sierotipi isolati con una bassa frequenza (< 10) e sierotipi isolati con un’alta frequenza (≥ 10), è stata effettuata un’analisi con il test di Shapiro-Wilk per valutare la distribuzione dei dati e il test di Wilcoxon una volta determinato che i dati non avessero una distribuzione normale. L’analisi effettuata tramite ANOVA non ha determinato alcuna differenza statisticamente significativa tra i sierotipi ($p=0,9931$), così come il test di Wilcoxon non è risultato essere significativo ($p=0,4940$). Si può dunque affermare che non c’è alcuna correlazione diretta tra i sierotipi e la concentrazione di *Salmonella* a livello ciecale, dunque non vi sono sierotipi capaci di conferire una contaminazione maggiore a livello ciecale rispetto ad altri; inoltre, si può affermare che non vi sono differenze tra sierotipi con alta e bassa prevalenza (grafico 1).

Grafico 1: Diagramma a barre che illustra la distribuzione dei sierotipi di *Salmonella* spp. in relazione alla media logaritmica in MPN.

Graph 1: Bar chart showing the logarithmic average in MPN for each *Salmonella* spp. serotype.



DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

La contaminazione da *Salmonella* delle carcasse di suino al macello è legata a una serie di fattori, tra cui ad esempio il numero di suini portatori all'ingresso, le modalità di macellazione, la quantità di suini macellati e il peso delle carcasse (Marier *et al.*, 2014). In questo contesto è spesso difficile correlare uno specifico fattore con un aumento del rischio di contaminazione delle carcasse.

Nel corso del presente studio, la contaminazione delle carcasse è risultata essere dipendente dal livello di contaminazione rilevato a livello ambientale, confermando l'ipotesi che il macello possa costituire un'importante fonte di *Salmonella* spp. per la carcassa (Hald *et al.*, 2003).

Tuttavia, l'analisi dei dati ha consentito di evidenziare una correlazione, se pur debole, tra il quantitativo di *Salmonella* presente a livello ciecale e il grado di contaminazione della carcassa dello stesso animale, come già rilevato da altri autori (Nauta *et al.*, 2013).

La seconda ipotesi presa in esame nel corso di questo lavoro è che un suino fortemente contaminato non costituisca un rischio solo per la propria carcassa, ma attraverso un processo di cross contaminazione e di contaminazione delle strutture, interessi anche altri animali macellati nella medesima giornata. Questa ipotesi è stata formulata sulla base di dati riportati in letteratura (Berends *et al.*, 1996, 1997; van Hoek *et al.*, 2012; Nauta *et al.*, 2013).

Per questo motivo oltre alla analisi dei singoli animali, è stato valutato anche il dato complessivo della giornata di macellazione. Il livello di contaminazione delle carcasse non è risultato dipendere dalla prevalenza di suini positivi per *Salmonella*, ma è risultato correlato al numero di suini che presentavano un'elevata carica di *Salmonella* a livello ciecale. In letteratura il quantitativo di *Salmonella* escreto dagli animali è stato correlato a numerosi fattori, tra i quali il sierotipo in esame, il tempo decorso dalla infezione, le difese immunitarie dell'ospite e la composizione del microbiota intestinale residente (Pieper *et al.* 2009; Pires *et al.*, 2014; Smid *et al.*, 2014).

Nel corso del presente lavoro tuttavia, non è stato possibile dimostrare una correlazione tra il sierotipo in esame e la carica di *Salmonella* spp. a livello ciecale.

I dati raccolti nel corso di questo lavoro sembrano quindi confermare l'ipotesi già avanzata da alcuni autori secondo i quali il dato qualitativo non sia di per sé sufficiente a motivare un rischio di contaminazione della carcassa, e che la quantità di *Salmonella* presente a livello ciecale possa avere una maggiore influenza sul grado di contaminazione delle carni (Nauta *et al.*, 2013). In quest'ottica, le misure di controllo per *Salmonella* lungo nella filiera suina dovrebbero essere focalizzate anche alla riduzione di suini altamente contaminati.

BIBLIOGRAFIA

Anonymous. EN ISO 17604:2003/E “*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Carcass sampling for microbiological analysis*” ISO 17604:2003/E

Anonymous. EN ISO 6579:2012/A1. “*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of Salmonella spp. in animal faeces and in environmental samples from the primary production stage*” ISO/TS 6579-2/2012(E)

Anonymous. EN ISO 7218:2007/E. “*Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*” ISO 7218:2007(E)

Berends B.R., Urlings H.A., Snijders J.M., Van Knapen F. (1996) “*Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding Salmonella spp. in pigs*”. Int J Food Microbiol.30(1-2):37-53

Berends B.R., Van Knapen F., Snijders J.M., Mossel D.A. (1997) “*Identification and quantification of risk factors regarding Salmonella spp. on pork carcasses*”. Int J Food Microbiol. 36(2-3):199-206

Bonardi S, Pizzin G, Lucidi L, Brindani F, Paterlini F, Tagliabue S. (2003) “*Isolation of Salmonella enterica from slaughtered pigs*”. Vet Res Commun. 27 Suppl. 1:281-3

Boughton C, Egan J, Kelly G, Markey B, Leonard N. (2007) “*Quantitative examination of Salmonella spp. in the lairage environment of a pig abattoir*”. Foodborne Pathog Dis. 4(1):26-32

Boyen F, Haesebrouck F, Maes D, Van Immerseel F, Ducatelle R, Pasmans F. (2008) “*Non-typoidal Salmonella infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control*”. Vet Microbiol. 130(1-2):1-19

Duggan SJ, Mannion C, Prendergast DM, Leonard N, Fanning S, Gonzales-Barron U, Egan J, Butler F, Duffy G. (2010) “*Tracking the Salmonella status of pigs and pork from lairage through the slaughter process in the Republic of Ireland*.” J Food Prot.;73(12):2148-60

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2014. “*The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012*”. EFSA Journal 2014;12(2):3547

- Hald T., Wingstrand A., Swanenburg M., von Altrock A., Thorberg BM. (2003) “*The occurrence and epidemiology of Salmonella in European pig slaughterhouses.*” *Epidemiol Infect.* 131(3):1187-203
- Magistrali C, Dionisi AM, De Curtis P, Cucco L, Vischi O, Scuota S, Zicavo A, Pezzotti G. (2008) “*Contamination of Salmonella spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse.*” *Res Vet Sci.* 85(2):204-7
- Marier E.A., Snow L.C., Floyd T., McLaren I.M., Bianchini J., Cook A.J., Davies R.H. (2014) “*Abattoir based survey of Salmonella in finishing pigs in the United Kingdom 2006-2007.*” *Prev Vet Med.* 1;117(3-4):542-53
- Nauta M., Barfod K., Hald T., Sorensen A.S., Emborg H. D., Aabo S. (2013) “*Prediction of Salmonella carcass contamination by a comparative quantitative analysis of E. coli and Salmonella during pig slaughter.*” *International Journal of Food Microbiology*, 166: 231-237
- O'Connor AM, Gailey J, McKean JD, Hurd HS. (2006). “*Quantity and distribution of Salmonella recovered from three swine lairage pens.*” *J Food Prot* 69(7):1717-9
- Pieper R, Bindelle J, Rossnagel B, Van Kessel A, Leterme P. (2009) “*Effect of carbohydrate composition in barley and oat cultivars on microbial ecophysiology and proliferation of Salmonella enterica in an in vitro model of the porcine gastrointestinal tract.*” *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:7006–7016
- Pires A.F.A., Funk J.A., Lim A., Bolin S.R. (2013) “*Enumeration of Salmonella in feces of naturally infected pigs.*” *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11):933-7
- Pires A.F., Funk J.A., Bolin C. (2014) “*Risk factors associated with persistence of Salmonella shedding in finishing pigs.*” *Prev Vet Med.* 116(1-2):120-8
- Popoff M.Y., Le Minor L. (2001) “*Antigenic Formulas of the Salmonella Serovars.*” (8th revision)WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris
- Rostagno MH, Hurd HS, McKean JD, Ziemer CJ, Gailey JK, Leite RC. (2003) “*Preslaughter holding environment in pork plants is highly contaminated with Salmonella enterica.*” *Appl Environ Microbiol.* 69(8):4489-94
- Smid JH, van Hoek AH, Aarts HJ, Havelaar AH, Heres L, de Jonge R, Pielaat A. (2014) “*Quantifying the sources of Salmonella on dressed carcasses of pigs based on serovar distribution.*” *Meat Sci.* 96(4):1425-31
- van Hoek AH, de Jonge R, van Overbeek WM, Bouw E, Pielaat A, Smid JH, Malorny B, Junker E, Löfström C, Pedersen K, Aarts HJ, Heres L. (2012) “*A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of Salmonella spp. in a pork slaughter-line.*” *Int J Food Microbiol.* 153(1-2):45-52

CONTROLLO DELLE INFEZIONI DA *SALMONELLA* NEL SUINO: STRATEGIE VACCINALI

CONTROLLING SALMONELLA INFECTIONS IN PIGS: VACCINATION PROTOCOLS

RUGGERI J.¹, PESCIAROLI M.^{2,3}, MARTINELLI N.¹, CHIRULLO B.²,
SCAGLIONE F.E.⁴, PREGEL P.⁴, AMMENDOLA S.⁵, LAZZARO M.¹, GIACOMINI E.¹,
OSSIPRANDI MC.⁶, BATTISTONI A.⁵, BOLLO E.⁴, PASQUALI P.², ALBORALI G.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124 Brescia, Italy;

²Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; FAO Reference Center for Veterinary Public Health.

³VISAVET Health Surveillance Centre. Universidad Complutense Madrid. 28040 Madrid. Spain.

⁴Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;

⁵Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;

⁶Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma, Italy;

Parole chiave: Vaccinazione, *Salmonella*, Suino, Immunogenicità, Sanità Pubblica.

Keywords: Vaccination, *Salmonella*, Pig, Immunogenicity, Public Health.

Riassunto

Salmonella sp. è uno dei principali responsabili di tossinfezioni alimentari dovute al consumo di prodotti contaminati di origine animale. Il suino è la principale fonte d'infezione, determinando l'ingresso del patogeno nella fase di macellazione. La situazione italiana è caratterizzata da un'elevata percentuale di allevamenti suini infetti, e la vaccinazione avrebbe un ruolo decisivo nel controllo dell'infezione, ma nessun vaccino è disponibile in commercio per il suino. L'obiettivo del nostro lavoro è quello di descrivere i dati relativi alla valutazione della sicurezza ed efficacia di un vaccino attenuato di *S.Typhimurium*, in condizioni sperimentali, e di un vaccino stabulogeno inattivato di *S.Typhimurium* var. Monofasica, testato in campo. Il ceppo attenuato è sicuro e protettivo, limitando l'eliminazione fecale e la colonizzazione degli organi del ceppo virulento e la sua efficacia è stata testata anche a seguito della somministrazione parenterale e in corso d'infezione eterologa con *S.Choleraesuis*. Il ceppo stabulogeno inattivato è stato somministrato in alcune scrofe in gestazione e/o nei loro suinetti. I buoni risultati ottenuti hanno confermato che la vaccinazione delle scrofe, e il trasferimento degli anticorpi tramite il colostro, è maggiormente protettiva rispetto alla diretta vaccinazione dei suini.

Abstract

First results.

Salmonella sp. is responsible of human infections due to consumption of contaminated pork products. Carrier pigs introduce bacteria in the slaughter process. Italian situation is characterized by a high percentage of infected farms, and vaccination could have a decisive role in controlling infection. Unfortunately, none vaccine, licensed for swine, is available in Italy. The aim of our work is to describe data related to efficacy and safety of an attenuated *S.Typhimurium* vaccine, tested in experimental conditions, and an inactivated autogenous vaccine, tested in field conditions. Attenuated strain is safe and protective, limiting fecal spread and organs colonization by virulent *S.Typhimurium* and it is also effective when

intramuscularly administered or challenge is performed with *S.Choleraesuis*. Inactivated autogenous vaccine was administered in pregnant sows and their piglets of two farms. The results of this trial confirmed that sows vaccination, therefore antibody transfer with colostrum, is more protective than direct piglets vaccination.

1. INTRODUZIONE

Salmonella spp. è un cocco-bacillo, Gram-, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile, non lattosio fermentante, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Ad oggi, sono stati identificati più di 2400 sierotipi che possono essere classificati in: sierotipi ospite-ristretti, in grado di provocare una manifestazione clinica sistemica tifoideale in uno spettro d'ospite limitato (*Salmonella* Typhi nell'uomo); sierotipi ospite-adattati, patogeni per una specie ospite, ma in grado di provocare la malattia anche in altre specie (*Salmonella* Choleraesuis e Typhisuis nei maiali); infine i sierotipi più numerosi che possono infettare un ampio spettro di ospiti determinando prevalentemente una forma morbosa localizzata a livello del tratto intestinale (Mastroeni et al., 2001). Alcuni di questi serovar (*S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* var. Monofasica, *S. Derby*, *S. Enteritidis*, etc.) (EFSA, 2010; Lettini AA, 2014) sono i principali responsabili d'infezione alimentare nell'uomo, caratterizzata da gastroenterite acuta conseguente al consumo di alimenti di origine animale contaminati e poco cotti (Beloil et al., 2004), e di danni economici per gli allevatori, come conseguenza della riduzione dell'indice di produzione o l'aumento della percentuale di morti (Selke et al., 2007; Hur et al., 2010).

A tutela della salute umana, la Comunità Europea ha emanato il Regolamento Europeo 2160/2003 per individuare e controllare alcune serovar di *Salmonella* lungo tutta la filiera alimentare. Durante l'ultimo decennio, il controllo dell'infezione in allevamento era essenzialmente legato all'uso di antibiotici, determinando però un aumento dei ceppi farmaco-resistenti e una riduzione del numero di principi attivi efficaci verso l'infezione, anche per la terapia nell'uomo (Selke et al., 2007). Al momento, le strategie per ridurre la prevalenza prevedono: misure igienico-sanitarie, metafilassi con mangimi medicati, probiotici ed acidi organici, misure di biosicurezza e controllo degli animali infettanti e programmi di monitoraggio sierologico. La vaccinazione rappresenterebbe la soluzione più efficace per ridurre l'infezione nei paesi che presentano un'alta percentuale d'isolamento di *Salmonella* –spp. al macello (Boyen, 2009; Hur, 2011). La situazione italiana è caratterizzata da un'elevata percentuale d'isolamenti di *S. Typhimurium* (29.3%) e *S. Typhimurium* var. Monofasica (28.9%) nell'uomo, principalmente causati dal consumo di prodotti di origine animale contaminati (Lettini AA, 2014). L'elevata percentuale di casi umani, l'incremento dell'antibiotico-resistenza e la mancata disponibilità in commercio di vaccini per il controllo dell'infezione negli allevamenti suini, ha indirizzato il nostro gruppo di lavoro a valutare l'efficacia di un vaccino attenuato in corso d'infezione sperimentale con *S. Typhimurium* (Pesciaroli et al., 2013; Gradassi et al., 2013; Ruggeri et al., 2014) o *S. Choleraesuis* (manoscritto in preparazione) e quella di un vaccino stabulogeno inattivato per il controllo dell'infezione in due allevamenti endemici (manoscritto in preparazione).

2. MATERIALI E METODI

2.1. Vaccino attenuato *S. Typhimurium* ΔZnuABC e vaccino stabulogeno *S. Typhimurium* var. Monofasica.

S. Typhimurium ΔZnuABC è un ceppo attenuato, ottenuto per inserzione di una cassetta di

resistenza al cloramfenicolo all'interno del gene *ZnuABC*, che codifica per un trasportatore dello zinco. L'attenuazione del ceppo è stata confermata *in vitro* e, successivamente, sono state verificate la sicurezza e l'efficacia del ceppo in un modello murino d'infezione sperimentale. Il vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante Monofasica è stato prodotto dopo l'isolamento da campioni provenienti da un allevamento endemico mediante amplificazione e inattivazione in formalina ed è stato somministrato alla dose 2×10^9 UFC.

2.2 Trial 1. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito della somministrazione orale.

La sicurezza e l'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito di somministrazione orale a due diversi dosaggi sono state testate in 26 suini magroni divisi in quattro gruppi, tre costituiti da 6 suini (A, B e C) e il quarto gruppo (D), che rappresenta il controllo, da 8 suini. I gruppi A e B sono stati vaccinati per via orale con *S. Typhimurium ΔZnuABC* alla dose di 5×10^8 e 5×10^7 UFC, il gruppo C è stato vaccinato con un vaccino inattivato di *S. Typhimurium* alla dose di 10^9 UFC. Il challenge è stato eseguito per via orale con 4×10^8 UFC di *S. Typhimurium* virulenta mediante sonda gastrica, al giorno 35 dopo la vaccinazione. Settimanalmente, sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 56, gli animali sono stati abbattuti ed è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica e istopatologica sugli organi.

2.3 Trial 2. Valutazione della sicurezza e dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito della somministrazione parenterale.

La sicurezza e l'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito di somministrazione parenterale sono state valutate in 25 suinetti divisi in 5 gruppi, costituiti da 5 animali. Il gruppo A è stato vaccinato IM con 10^4 UFC di *S. Typhimurium ΔZnuABC*, il gruppo B e C sono stati vaccinati per via orale con *S. Typhimurium ΔZnuABC* alla dose di 5×10^7 e 5×10^5 UFC, il gruppo D non è stato vaccinato. Il challenge è stato eseguito per via orale mediante sonda gastrica, solo nel gruppo E per simulare un modello d'infezione pseudo-naturale (seeder model), con 4×10^8 UFC di *S. Typhimurium* virulenta al giorno 42 dopo la vaccinazione. Gli animali sono rimasti a contatto con gli eliminatori del gruppo E per 2 settimane. Settimanalmente, sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 28 dopo il contatto tra gli infetti e gli altri gruppi, gli animali sono stati abbattuti ed è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica e istopatologica sugli organi.

2.4 Trial 3. Valutazione dell'efficacia del vaccino attenuato S. Typhimurium ΔZnuABC a seguito del challenge con S. Choleraesuis.

L'efficacia di *S. Typhimurium ΔZnuABC* a seguito d'infezione sperimentale con *S. Choleraesuis* è stata testata in 18 suinetti divisi in 3 gruppi, ognuno costituito da 6 animali. Il gruppo A è stato vaccinato per OS con 5×10^8 UFC di *S. Typhimurium ΔZnuABC*, il gruppo B è stato vaccinato per via IM con *S. Choleraesuis* inattivato, il gruppo C non è stato vaccinato ed il challenge è stato eseguito per via orale mediante sonda gastrica con 5×10^8 UFC di *S. Choleraesuis* virulenta al giorno 35 dopo la vaccinazione. Settimanalmente sono stati prelevati campioni di sangue, feci e tamponi ambientali per l'analisi sierologica e microbiologica. Al giorno 47 è stata eseguita l'autopsia per l'analisi microbiologica degli organi.

2.5 Trial 4. Valutazione dell'efficacia del vaccino stabulogeno in due allevamenti endemici.

L'efficacia del vaccino stabulogeno *S.Typhimurium* var. Monofasica è stata testata in un allevamento endemico e 40 scrofe sono state divise in due gruppi: 20 vaccinate e 20 non vaccinate. Le 40 nidiare, provenienti da tali scrofe, sono state in seguito divise in gruppi: 20 nidiare provenienti da scrofe vaccinate sono state divise in due gruppi, un gruppo vaccinato e il secondo gruppo non vaccinato. Similmente, le 20 nidiare provenienti da scrofe non vaccinate sono state divise in vaccinate e non vaccinate, formandosi 4 gruppi: 1 suinetti vaccinati figli di scrofe vaccinate, 2 suinetti non vaccinati figli di scrofe vaccinate, 3 suinetti vaccinati figli di scrofe non vaccinate e 4 suinetti non vaccinati figli di scrofe non vaccinate. Le scrofe sono state vaccinate 6 e 2 settimane prima del parto e i suinetti sono stati immunizzati a 4 e 8 settimane dalla nascita. Gli animali sono stati seguiti dalla nascita alla macellazione e i prelievi di sangue e feci sono stati eseguiti in ogni fase produttiva (svezzamento, magronaggio, ingrasso e macellazione). La stessa prova è stata condotta in un secondo allevamento con un numero dimezzato di animali.

2.6 Microbiologia e Sierologia

Le analisi microbiologiche, condotte in accordo alla procedura ISO 6579:2002, hanno lo scopo di determinare il titolo nei campioni in esame di *Salmonella* spp. I campioni positivi sono inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, il quale definisce il sierotipo coinvolto mediante tipizzazione sierologica. Inoltre, le colonie sospette sono state sottoposte all'identificazione in PCR per distinguere il ceppo virulento da *S.Typhimurium* *AznuABC*.

L'analisi sierologica è stata condotta usando un kit commercial per l'esecuzione dell'ELISA indiretta in grado d'identificare anticorpi verso i sierogruppi B, C1 e D di *Salmonella* (Herd-Check Swine *Salmonella* Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories Inc., Switzerland).

3. RISULTATI

3.1 Sicurezza ed efficacia di *S.Typhimurium* *AznuABC* a seguito della vaccinazione orale

Analizzando la sicurezza del ceppo attenuato nei due gruppi trattati (A e B), abbiamo registrato un leggero rialzo febbrile fino al secondo giorno post-vaccinazione. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata rilevata nel ritmo di crescita tra soggetti vaccinati e i controlli e la concentrazione di *S.Typhimurium* *AznuABC* nelle feci è progressivamente diminuita fino alla negatività, al giorno 28 dopo la vaccinazione. Analizzando l'efficacia del ceppo attenuato, abbiamo riscontrato assenza di segni clinici nel gruppo A e B a seguito dell'infezione con il ceppo virulento, a differenza degli animali del gruppo C e D che hanno invece mostrato prostrazione, anoressia, incremento transitorio della temperatura corporea a 2 giorni dal challenge e riduzione del peso corporeo.

Tutti i gruppi vaccinati producono l'IFN- γ a 7 giorni dal challenge, mentre il gruppo D raggiunge un picco di produzione d'IFN- γ solo dopo tre settimane. La concentrazione fecale di *S.Typhimurium* nei gruppi vaccinati (A e B) subisce una radicale diminuzione dal secondo giorno post-infezione. All'abbattimento, *S. Typhimurium* ha colonizzato gli organi degli animali dei gruppi A e B a concentrazioni inferiori rispetto ai gruppi C e D, inoltre i soggetti vaccinati con il ceppo inattivato hanno una maggiore colonizzazione a carico degli organi linfatici e una minore colonizzazione degli organi intestinali rispetto al gruppo D.

3.2 Sicurezza ed efficacia di *S.Typhimurium* Δ znuABC a seguito della vaccinazione parenterale

Analizzando la sicurezza del vaccino attenuato nei tre gruppi vaccinati (A, B e C), non abbiamo evidenziato l'eliminazione fecale di *S.Typhimurium* Δ znuABC nel gruppo immunizzato per via IM.

L'eliminazione fecale del ceppo virulento di *S.Typhimurium* è inferiore nei gruppi A e B (con A>B) rispetto agli altri gruppi; inoltre, dopo la prima settimana, il trend d'eliminazione decresce rapidamente. Le tonsille e i linfonodi sono scarsamente colonizzati negli animali vaccinati (A, B e C) e la differenza nella colonizzazione del colon tra gli animali del gruppo B e D è statisticamente significativa. All'esame autoptico, il gruppo A presenta l'ispessimento della parete dell'ileo rispetto al gruppo B, negli altri gruppi è stata osservata anche reattività dei linfonodi ileocolici. Dal punto di vista istopatologico, il gruppo C e D hanno evidenziato le lesioni più gravi con conglutinazione epiteliale e necrosi.

3.3 Efficacia di *S.Typhimurium* Δ znuABC a seguito del challenge con *S.Choleraesuis*.

La vaccinazione con il ceppo attenuato riduce la febbre causata dall'infezione sperimentale con *S.Choleraesuis* e la colonizzazione di tonsille, linfonodi ileocecali, ileo, cieco e colon. Diversamente, poche differenze si registrano nella colonizzazione degli organi di suini vaccinati con il vaccino inattivato e non vaccinati. Infine, la vaccinazione con il ceppo attenuato induce una pronta risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata nei suini infettati con *S.Choleraesuis*, indicando che è possibile una parziale cross-protezione con il ceppo eterologo di *S.Typhimurium*.

3.4 La vaccinazione delle scrofe con un vaccino stabulogeno di *S.Typhimurium* var. *Monofasica*, è protettiva verso l'infezione dei loro suinetti.

La vaccinazione delle scrofe e delle loro nidiate migliora l'accrescimento dei suini. Le differenze sono statisticamente significative, in tutte le fasi di produzione, tra il gruppo non vaccinato proveniente da scrofe non vaccinate e il gruppo vaccinato proveniente da scrofe vaccinate. L'analisi sierologica ha evidenziato una riduzione della circolazione del patogeno nei suini, figli di scrofe vaccinate, sia in fase di lattazione sia in fase di accrescimento/ingrasso. L'intervento immunizzante delle scrofe non limita l'eliminazione fecale delle madri, ma riduce il numero di suini eliminatori. L'analisi della colonizzazione degli organi ha evidenziato una differenza statisticamente significativa a livello delle tonsille tra i suini vaccinati figli di scrofe vaccinate e suini non vaccinati figli di scrofe non vaccinate. Quest'aspetto è di fondamentale importanza, considerando che, le tonsille sono gli organi responsabili del mantenimento delle infezioni croniche.

4. DISCUSSIONE

La salmonellosi negli allevamenti suini è un danno economico a carico degli allevatori ed è un pericolo per la salute dei consumatori (Selke et al., 2007). Negli allevamenti con alto indice di prevalenza, la vaccinazione, associata alle buone pratiche manageriali, è lo strumento più valido nel controllo dell'infezione (Hotes et al., 2011). Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di confrontare la sicurezza e l'efficacia di due categorie di vaccini: i vaccini attenuati e i vaccini stabulogeni inattivati. La vaccinazione eseguita con un ceppo attenuato è caratterizzata da una maggiore protezione dei soggetti trattati, poiché il vaccino

attenuato mima in modo più efficace l'infezione con il ceppo virulento, attivando la risposta immunitaria cellulo-mediata, protettiva verso i batteri, parassiti facoltativi endocellulari, come *Salmonella* (Meeusen et al., 2007). La vaccinazione con il ceppo inattivato induce prevalentemente una risposta immunitaria umorale, tuttavia le immunoglobuline prodotte non sono completamente efficaci nel controllo dell'infezione da *Salmonella*.

I nostri esperimenti hanno dimostrato che *S.Typhimurium* Δ znuABC non è patogeno per i suini in accrescimento, è immunogeno, poiché stimola la risposta immunitaria cellulo-mediata, caratterizzata da una rapida e cospicua produzione d'IFN- γ a seguito del challenge ed è efficace, poiché la clearance di *S.Typhimurium* o *S.Choleraesuis* è più rapida nei suini vaccinati e la concentrazione di colonizzazione degli organi di questi soggetti è minore rispetto agli altri gruppi. È presumibile sostenere che la vaccinazione con *S.Typhimurium* Δ znuABC protegga dalla malattia e riduca il numero di portatori nell'allevamento.

La vaccinazione con il vaccino stabulogeno inattivato ha evidenziato migliore crescita dei suini, riduzione del numero di suinetti eliminatori ed inferiore colonizzazione degli organi in fase di macellazione. Il ruolo fondamentale è attribuibile all'immunità materna, poiché la vaccinazione delle scrofe determina un incremento delle immunoglobuline e il loro trasferimento nel colostro. Il trasferimento di IgAs ai suinetti tramite il colostro provoca un incremento dell'immunità mucosale a livello intestinale, di conseguenza gli animali risultano maggiormente protetti verso l'infezione da *Salmonella*, che ha un ciclo feco-orale e l'intestino rappresenta l'organo bersaglio (De Busser, 2013). La sola vaccinazione dei suinetti con il vaccino stabulogeno non è ugualmente protettiva perché gli anticorpi ematici non sono protettivi a livello intestinale e, a livello sistemico, la protezione è maggiormente determinata dall'immunità cellulo-mediata.

Alla luce di questi risultati, il migliore protocollo vaccinale, per garantire una completa protezione dei suini in allevamento, è caratterizzato da una vaccinazione delle scrofe con vaccino inattivato durante il periodo preparto, seguito dalla vaccinazione dei suini, durante la fase di svezzamento quando l'immunità materna colostrale è in declino, con un vaccino attenuato di *Salmonella*.

BIBLIOGRAFIA:

1. Beloeil P.A., Chauvin C., Proux K., Madec F., Fravallo P., Alioum A. (2004) "Impact of the *Salmonella* status of market-age pigs and the pre-slaughter process on *Salmonella* caecal contamination at slaughter". *Vet Res* 35, 513-530.
2. Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., Van Immerseel F., Ducatelle R., Pasmans F. (2009) "Non- typhoidal *Salmonella* infections in pigs: A closer look at epidemiology, pathogenesis and control". *Vet Microbiology* 130, 1-19.
3. De Busser E.V., De Zutter L., Dewulf J., Houf K., Maes D. (2013) "*Salmonella* control in live pigs and at slaughter." *Vet J.* 196, 20-27.
4. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens (2010). <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1546.pdf>.
5. Hotes S., Traulsen I., Krieter J. (2011) "*Salmonella* control measures with special focus on vaccination and logistic slaughter procedures". *Transbound Emerg Dis.* 58(5):434-44.
6. Hur J., Lee J.H. (2010) "Immunization of pregnant sows with a novel virulence gene deleted live *Salmonella* vaccine and protection of their suckling piglets against salmonellosis". *Vet Microbiol* 143, 270-276.
7. Hur J., Song S.O., Lim J.S., Chung I.K., Lee J.H. (2011) Efficacy of a novel virulence gene-deleted *Salmonella* Typhimurium vaccine for protection against *Salmonella* infections

in growing piglets". *Vet Immunol Immunopathol* 139, 250-256.

8. Lettini A.A., Saccardin C., Ramon E., Longo A., Cortini E., Dalla Pozza M.C., Barco L., Guerra B., Luzzi I., Ricci A. (2014). "Characterization of an unusual *Salmonella* phage type DT7a and report of a foodborne outbreak of salmonellosis." *Int J Food Microbiol.* 17;189:11-7.
9. Mastroeni P., Chabalgoity J.A., Dunstan S.J., Maskell D.J., Dougan G. (2001) "Salmonella: Immune responses and vaccines". *Vet J* 131, 132-164.
10. Meeusen E.N., Walker J., Peters A., Pastoret P.P., Jungersen G. (2007) "Current status of veterinary vaccines." *Clin Microbiol Rev.* 20(3):489-510. Review.
11. Selke M., Meens J., Springer S., Frank R., Gerlach G.F. (2007) "Immunization of pigs to prevent disease in humans: construction and protective efficacy of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live negative-marker vaccine". *Infect Immun* 75, 2476-83.
12. Pesciaroli M., Gradassi M., Martinelli N., Ruggeri J., Pistoia C., Raffatellu M., Magistrali C.F., Battistoni A., Pasquali P., Alborali G.L. (2013). "Salmonella Typhimurium lacking the Znuabc transporter is attenuated and immunogenic in pigs". *Vaccine.* 31, 2868-73.
13. Gradassi M., Pesciaroli M., Martinelli N., Ruggeri J., Petrucci P., Hassan W.H., Raffatellu M., Scaglione F.E., Ammendola S., Battistoni A., Alborali G.L., Pasquali P. (2013) "Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium lacking the ZnuABC transporter: an efficacious orally-administered mucosal vaccine against salmonellosis in pigs". *Vaccine.* 31, 3695-701.
14. Ruggeri J., Pesciaroli M., Gaetarelli B., Scaglione F.E., Pregel P., Ammendola S., Battistoni A., Bollo E., Alborali G.L., Pasquali P. (2014) "Parenteral administration of attenuated *Salmonella Typhimurium* Δ znuABC is protective against salmonellosis in piglets." *Vaccine* 7;32(32):4032-8.

VALUTAZIONE DEI FATTORI CONDIZIONANTI LA STREPTOCOCCOSI NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO

EVALUATION OF STREPTOCOCCOSIS CONDITINING FACTORS IN SWINE FARMING

ZAVATTINI S.¹, SALA V.², GUSMARA C.², GUADAGNINI G.³, COSTA A.⁴

¹Med. Vet. L. P., swinevetgroup, Mantova; ²Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica - Università di Milano; ³Med. Vet. L. P. PigVet, Brescia; ⁴Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare - Università di Milano

Parole chiave: streptococchi, artrite, meningite, ordine di parto

Key words: streptococcosis, arthritis, meningitis, parity

Riassunto

In questo studio sono state individuate e verificate le correlazioni tra il livello di parto e l'effettiva incidenza delle manifestazioni cliniche chiaramente riportabili alla streptococcosi (artrite tarsica in sala parto e meningite in sala parto e svezzamento). *Streptococcus suis* è uno dei più importanti patogeni opportunisti nella moderna produzione suinicola. Nell'allevamento intensivo, il periodo critico è compreso fra le 4 e le 10 settimane di vita, con un picco clinico che si raggiunge nei primi giorni dopo lo svezzamento, come conseguenza del rimescolamento di più nidi, dell'esaurimento dell'immunità materna e di infezioni concomitanti soprattutto di natura virale. Il serbatoio principale del batterio in azienda è rappresentato dalle tonsille e dall'apparato genitale delle scrofe che ricevono o trasmettono l'infezione alle scrofe di recente introduzione e ai suinetti; questi ultimi probabilmente si infettano con il batterio in modi diversi a causa dello stretto contatto con la scrofa, con le sue escrezioni e secrezioni (muco vaginale, saliva, urine, feci, muco nasale) e con le superfici contaminate della gabbia. Tale studio ha dimostrato che le percentuali di artriti e scarti sono risultate positivamente correlate con la percentuale di primipare che genera la svezzata, in generale, la percentuale di lesioni tarsiche, di meningiti, e di trattamenti terapeutici è risultato più alto nelle primipare.

Abstract

In this study the correlation between parity (primiparous or multiparous sows) and the actual incidence of clinical manifestations of streptococcosis (tarsal arthritis in meningitis at weaning time of piglets) was identified and verified. *Streptococcus suis* is one of the most important opportunistic pathogens in modern pig production. In the intensive breeding, the critical period is between 4 and 10 weeks of life, with a clinical peak reached in the first days after weaning, as a result of the mixing of multiple litters, exhaustion of maternal immunity and rising of viral infections. The main reservoir of the bacterium is represented by the tonsils and by the genital apparatus of sows that receive or transmit the infection to the recent introduction or mixing of gilts and piglets. Piglets probably become infected in different ways because of the close contact with the sow, with its excretions and secretions (vaginal mucus, saliva, urine, faeces, nasal mucus) and with the contaminated surfaces of the cage. This study showed that the clinical manifestations of streptococcosis were positively correlated with the percentage of primiparous sows; in general, the percentage of tarsal lesions, meningitis in piglets, and therapeutic treatments was higher in primiparous sows.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis è uno dei più importanti patogeni opportunisti nella moderna produzione suinicola: causa meningiti, broncopolmoniti, artriti, endocarditi, polisierositi e setticemia con morte improvvisa. Nell'allevamento intensivo, il periodo critico è compreso fra le 4 e le 10 settimane di vita, con un picco clinico che si raggiunge nei primi giorni dopo lo svezzamento, come conseguenza del rimescolamento di più nidiate, dell'esaurimento dell'immunità materna e di infezioni concomitanti soprattutto di natura virale. Il serbatoio principale del batterio in azienda è rappresentato dalle tonsille e dall'apparato genitale delle scrofe che ricevono o trasmettono l'infezione alle scrofette di recente introduzione e ai suinetti; questi ultimi probabilmente s'infettano con il batterio in modi diversi a causa dello stretto contatto con la scrofa, con le sue escrezioni e secrezioni (muco vaginale, saliva, urine, feci, muco nasale) e con le superfici contaminate della gabbia; durante la fase di allattamento un aspetto particolarmente critico è rappresentato dal pareggiamento delle figliate con conseguente rimescolamento di suinetti con condizione sanitaria differente e soprattutto con diverso corredo immunitario (figli di scrofette vs figli di pluripare). La trasmissione avviene quindi principalmente per via oro-nasale e la prima localizzazione avviene nelle tonsille palatine, ove può permanere per oltre un anno, anche alla presenza di una risposta immunitaria. Nelle prime settimane di vita non è da escludere la trasmissione orizzontale dell'infezione attraverso manualità traumatiche quali il taglio della coda o dei denti, la castrazione e il tatuaggio effettuati con materiale infetto o in condizioni igieniche precarie. Le forme cliniche latenti, acute o croniche sono condizionate, nella loro evoluzione, da fattori predisponenti ambientali o individuali, ma anche dal grado di patogenicità dei ceppi batterici coinvolti.

Per intraprendere un corretto percorso diagnostico nei confronti delle infezioni da *S. suis* è necessario calibrare il proprio intervento sulla situazione aziendale e la selezione del campione; mentre la diagnosi presuntiva dell'infezione si basa sui sintomi e sulle lesioni macroscopiche, la conferma si raggiunge con l'isolamento dell'agente infettivo e con l'evidenziazione delle lesioni microscopiche nei tessuti; è anche possibile, prescindendo dalle casistiche cliniche in atto, procedere alla qualificazione epidemiologico-diagnostica delle aziende problema. La prevenzione si basa sul controllo dei fattori predisponenti e sulla medicazione antibiotica preventiva.

La streptococcosi è un tipico esempio di malattia condizionata dall'intensivizzazione dell'allevamento suino. Tipicamente, la qualità del management è fondamentale nel controllo della malattia; la corretta gestione dei flussi e della densità, la gestione corretta del pareggiamento sotto scrofa, la riduzione del rimescolamento nelle varie fasi, il controllo microclimatico e l'adozione dei nuovi sistemi di allevamento (bande, MEW, SEW) sono le azioni più efficaci.

Scopo del presente lavoro è approfondire gli aspetti epidemiologici dell'infezione presentando le criticità più comuni nel moderno allevamento industriale e valutarne le possibilità di controllo soprattutto su base gestionale.

MATERIALI E METODI

La prova si è svolta nel periodo ottobre 2013 - marzo 2014 in un allevamento industriale a ciclo chiuso situato in provincia di Mantova; l'azienda ha una consistenza di circa 1000 scrofe in produzione ed è suddivisa in due unità produttive situate a breve distanza una dall'altra: una destinata ai settori gestazione / maternità / svezzamento e l'altra ai settori magronaggio e ingrasso. La scrofaia è gestita in bande settimanali, applicando il sistema tutto vuoto/tutto pieno per singola unità produttiva. La linea femminile origina da gran-parentali Large White e Landrace di origine italiana (genetica ANAS) incrociati con verri di razza Duroc; la rimonta

è in parte interna e in parte proveniente da un'altra azienda del gruppo anch'essa entrata a far parte dello studio. La quota di rimonta si attesta attorno al 45% e l'età media alla prima copertura è di circa 250 giorni. Le scrofe sono sottoposte a vaccinazione con cadenza trimestrale nei confronti della malattia di Aujeszky e PRRS mentre l'immunizzazione per Parvovirus suino e Mal Rosso è eseguita in sala parto a metà lattazione. Tutte le operazioni di profilassi e terapia iniettiva sono effettuate con cambio ago per singolo animale.

Esistono complessivamente 16 sale parto, ognuna con 14 gabbie e pavimentazione in grigliato di ferro; le scrofe vi entrano, in regime di tutto pieno-tutto vuoto, 2-3 giorni prima della fine della gestazione. Il nido per i suinetti è riscaldato mediante lampada a raggi infrarossi e serpentina con acqua calda al di sotto del tappetino. Le figliate sono pareggiate per numero, entro le prime 24 ore, solo in casi di evidente disomogeneità mentre non è previsto un pareggiamento per dimensioni. Entro i primi 3 giorni di vita si eseguono il taglio della coda e la somministrazione di ferro destrano mentre entro il settimo giorno si eseguono castrazione e somministrazione di ceftiofur long-acting; a circa 25 giorni di vita si esegue la vaccinazione per PCV2. Lo svezzamento avviene mediamente a 28 giorni di vita, separando gli animali in base al peso e al sesso collocandoli in 8 sale (con gabbiette di tipo flat-deck in metallo), ognuna delle quali predisposta per un carico di circa 260 suinetti ciascuna e in una batteria di capannine di svezzamento per circa 550 capi.

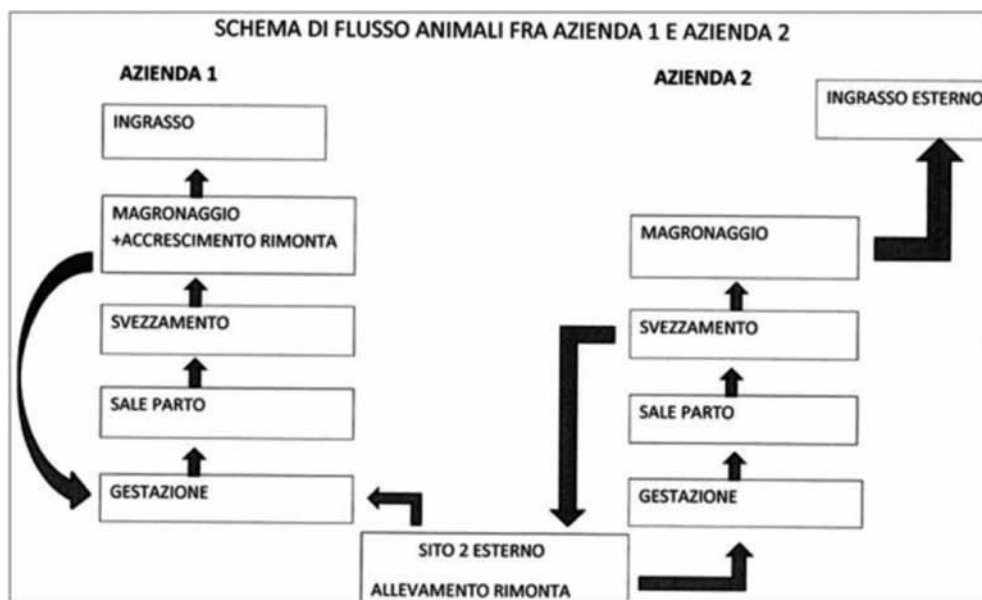


Figura 1. Schema di flusso nell'azienda suinicola oggetto dello studio.

Figure 1. Flow scheme of the study pig-farm.

Rilevazione dati in sala parto.

Per ciascuna sala, è stato rilevato l'intervallo di parto, il numero di primipare e pluripare presenti, il numero di nati vivi, la percentuale di mortalità e scarti, il numero di pareggiamenti, la percentuale di suinetti con lesioni tarsiche allo svezzamento, l'applicazione o meno di trattamenti profilattici di massa e il numero di casi clinici di meningite nel periodo di osservazione.

in modo da rilevare l'effetto delle due unità produttive e dell'ordine di parto (primipare vs pluripare) sulla percentuale di meningiti, artriti e trattamenti terapeutici condotti in azienda.

RISULTATI

I risultati fino a oggi disponibili sono stati ordinati nelle tabelle seguenti.

Gruppo	Primipare	Pluripare	Totale	% Primipare	Artriti %	% mortalità	% scarti	% Meningiti
1	31	102	133	23.3	6.4	8.8	5.9	0.8
2	36	98	134	26.9	7.2	11	5.9	0.6
3	66	67	133	49.6	7.8	8.8	6.2	0.9
4	12	121	133	9.0	5.5	10.3	4.3	0.2
5	23	112	135	17.0	5.9	10.6	4.5	0.5
6	24	109	133	18.0	5.8	9.5	2.9	0.4
7	31	102	133	23.3	6.3	10.0	4.6	0.5
8	3	131	134	2.2	4.6	14.2	2.5	0.2
9	29	92	121	24.0	3.9	9.3	2.8	0.6
10	24	96	120	20.0	4.2	7.5	2.9	0.3

Tabella 1. Riassuntivo della sala parto dell'unità 1.

Table 1. Summary of the data of the farrowing unit 1.

Per una maggiore gestibilità dei dati e per facilitare l'interpretazione contestuale dei dati abbiamo gestito i dati delle sale parto in gruppi di 10 unità ciascuna; sono stati utilizzati parametri e correlazioni che nella nostra precedente esperienza epidemiologico-diagnostica si sono dimostrati indicativi della presenza e dell'entità del "problema streptococco" nei singoli allevamenti.

Gruppo	Prim	Plur	Totale	% Prim	Artriti %	% mort.	% scarti	% Men
1	17	102	119	17	4.4	13.1	2.7	1.1
2	18	133	151	14	4.5	15.5	2.6	0.6
3	55	365	420	15	3.8	13.1	0.7	0.6
4	0	130	130	0	4.4	14.0	2.7	0.7
5	21	106	127	20	3.0	11.6	2.0	1.0
6	10	97	107	10	3.9	11.7	1.2	1.0

Tabella 2. Riassuntivo della sala parto dell'unità 2.

Table 2. Summary of the data of the farrowing unit 2.

Numerosità e percentuale di scrofe primipare nel gruppo che genera la svezzata, percentuale di meningiti durante l'allattamento e di artriti tarsiche al momento dello svezzamento, insieme alla mortalità in sala parto, sono stati considerati parametri indicativi della rilevanza del problema. Prima di qualsiasi analisi e considerazione conseguente, è opportuno considerare la grande mole dei dati prodotti da questo studio sperimentale.

Nel sistema italiano, in conseguenza delle indicazioni a suo tempo prodotte da questo gruppo di ricerca, le lesioni tarsiche sono correntemente utilizzate come indicatore dell'entità

dell'eliminazione di *S. suis* da parte delle scrofe durante la lattazione, della sua localizzazione nei lattonzoli e dell'effettiva diffusione nelle figliate; la percentuale di suinetti svezzati con artrite tarsica rappresenta poi un indicatore di rischio anche nei confronti della meningite nella successiva fase di svezzamento.

Facendo base su questo rilievo sistematicamente applicato, in molti allevamenti sono gestiti i trattamenti antibatterici delle scrofe nel peri-parto; questi interventi sono mirati alla riduzione dell'eliminazione di *S. suis* da parte delle stesse nei giorni iniziali della lattazione, che sono quelli a maggior rischio.

Sono stati verificati, come già indicato in premessa, i fattori strettamente dipendenti dalle scelte manageriali che possono interferire sulla diffusione dell'infezione nei lotti di produzione, ma anche sull'incidenza delle forme cliniche e perciò sulla produttività dei gruppi.

Tra questi, oltre alle conseguenze della presenza di suinetti derivati dalle scrofe primipare, di cui si è già detto, sono da considerare con attenzione il rimescolamento delle figliate nei lotti di svezzamento e i trattamenti applicati a scopo metafilattico.

Per il rimescolamento è stato già dimostrato per altre batteriosi opportunistiche (salmonellosi, malattia degli edemi, epidermite essudativa) come la presenza di un numero elevato di soggetti "primipare-derivati" sia favorente la diffusione delle infezioni nei gruppi; ciò dipende principalmente dallo squilibrio tra il livello di protezione passiva conferito dalle madri e la prevalenza delle infezioni silenti, che mobilitano e si diffondono all'esaurimento della protezione stessa. Un modello siffatto si può applicare in misura ottimale anche alla streptococcosi.

Considerando invece il ruolo dei trattamenti antibatterici applicati a scopo terapeutico e soprattutto preventivo, è opportuno ricordare come la sensibilità di *Streptococcus suis* ai beta-lattamici, pur non raggiungendo livelli di totale resistenza, sia progressivamente diminuita, specialmente dopo l'introduzione dell'uso routinari delle premiscele a base di ampicillina, amoxicillina e penicillina. Ciò ha determinato un progressivo innalzamento dei dosaggi e dei tempi di somministrazione, senza modificare l'epidemiologia aziendale dell'infezione e, anzi, selezionando in qualche caso gli stipti batterici più resistenti. Considerando entrambe le sale parto congiuntamente, anche in forza della quantità ridotta di dati disponibili per l'allevamento 2, sono stati ottenuti i dati presentati in Tabella 3 con i dati medi relativi ad entrambi gli allevamenti e la Tabella 4 relativa allo studio delle correlazioni tra i parametri: ordine di parto (primipare e pluripare), e percentuali di lesioni tarsiche (artriti), meningiti, mortalità e scarti.

Variabili	Media	Std Dev
% DI ARTRITI	5.10	1.35
% DI MORTALITA'	11.19	2.27
% DI SCARTI	3.40	1.66
% DI MENINGITI	0.62	0.28
% DI PRIMIPARE	17.41	11.47
% DI PLURIPARE	82.59	11.47

Tabella 3. Dati medi registrati in azienda (nelle due unità).

Table 3. Mean values of recorded data in the two sub- units in the pig farm.

Dall'analisi risultano positivamente correlate le percentuali di artriti e scarti ($r=65\%$; $P<0.01$) con la percentuale di primipare che genera la svezzata, mentre la correlazione è negativa per la percentuale di mortalità nello stesso periodo ($P<0.01$).

	% DI ARTRITI	% DI MORTALITA'	% DI SCARTI	% DI MENINGITI	% DI PRIMIPARE
% DI ARTRITI	1.000	-0.416	0.908	-0.123	0.646
		NS	P<0.001	NS	P<0.01
% DI MORTALITA'		1.000	-0.505	0.125	-0.645
			P<0.05	NS	P<0.01
% DI SCARTI			1.000	-0.072	0.649
				NS	P<0.01
% DI MENINGITI				1.000	0.248
					NS

Tabella 4. Pearson correlation dei parametri rilevati.

Table 4. Pearson correlation of the recorded parameters.

Da queste osservazioni, per ora limitate al periodo della sala parto, appare evidente l'importanza dell'effetto della quantità di primipare nel gruppo che genera la svezzata; ciò è vero rispetto alla circolazione dell'infezione streptococcica, ma anche nei confronti dell'effettiva redditività delle figliate generate dalle primipare, che contribuiscono maggiormente all'incidenza dell'artrite tarsica.

Al contempo, i gruppi di svezzamento con una maggiore presenza di figli delle primipare mostrano una riduzione significativa della mortalità, ma anche un altrettanto significativo aumento della percentuale di scarti, probabilmente giustificata dalla minore protezione immunitaria passiva, che permette una maggiore circolazione di tutte le infezioni contestualmente all'esaurimento della sua efficacia protettiva.

Nella figura 3 sono riportati i dati relativi all'analisi della varianza condotta al fine di rilevare il livello di lesioni tarsiche, meningiti e trattamenti antibatterici effettuati nelle due unità dell'allevamento: risulta evidente come sia la percentuale di lesioni tarsiche, di meningiti, e di trattamenti terapeutici sia più alto in maniera significativa nelle primipare.

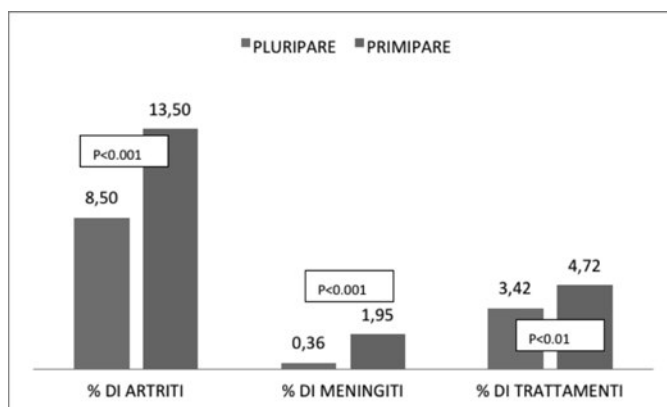


Figura 3. Medie riferite alla percentuale di lesioni tarsiche e meningiti nei suinetti, di trattamenti in dipendenza dell'ordine di parto (primipara- multipara)

Figure 3. LS mean values of percentages of arthritis and meningitis, anti-bacterial treatments according to parity.

DISCUSSIONE

Le manifestazioni cliniche dell'infezione streptococcica continuano a causare gravi perdite, sia come danno economico diretto dovuto alla mortalità e alla formazione di scarti, sia indirettamente come aumento dei costi di gestione (medicazioni e terapie parenterali, gestione degli scarti).

Su queste basi, gran parte degli allevatori e, purtroppo, anche molti veterinari hanno riposto un'eccessiva fiducia nella possibilità di controllare la patologia e l'infezione mediante l'impiego terapeutico individuale e strategico degli antibatterici; in realtà nessun trattamento è talmente efficace da impedire l'infezione, mentre l'impiego eccessivo della medicazione di massa sta determinando una graduale perdita di efficacia dei principi tradizionalmente più attivi su *S. suis*.

Il problema "streptococcosi suina" è stato affrontato da numerosi studiosi della materia (Clifton-Hadley, Fittipaldi, Gottschalk, Segura, Takada e altri, si vedano i riferimenti bibliografici a fine lavoro) con un approccio che si è gradualmente modificato nel tempo: dai classici studi epidemiologici, clinici e terapeutici si è passati a studi sempre più particolari delle caratteristiche genomiche del batterio e dei fattori di patogenicità. Prova ne è la scarsità di lavori pubblicati in bibliografia nazionale e internazionale riguardo a epidemiologia e prevenzione della malattia: solo due comunicazioni nell'IPVS 2014, tre nell'ESPHM 2014 e quattro in tutto il 2013.

Per queste ragioni abbiamo scelto un approccio che considerasse i principali fattori di amplificazione aziendale della patologia e valutasse le possibilità di controllo soprattutto su base gestionale.

CONCLUSIONI

Ancora oggi mancano, nel nostro Paese, indicazioni realmente affidabili sull'effettiva incidenza della malattia streptococcica, intesa come problema sanitario e produttivo, come causa di mortalità nello svezzamento e formazione di scarti nelle fasi successive del ciclo; tutto questo, nonostante la patologia sia enzootica da anni nella quasi totalità degli allevamenti intensivi.

Nella pratica aziendale quotidiana, viene per lo più considerata un problema inevitabile con il quale è necessario convivere, utilizzando trattamenti metafilattici che sono, il più delle volte, considerati l'unico metodo possibile per la prevenzione di tutti i livelli del danno.

D'altra parte, e come già accennato, tutta l'attività più recente di ricerca è stata indirizzata verso l'agente eziologico nelle sue connotazioni genomiche, trascurando gli aspetti più "pratici" del problema, vale a dire la presenza ancora attiva e talvolta non "gestibile" della malattia nelle prime fasi di vita dei suinetti.

Anche per queste ragioni, si è persa, anche da parte dei veterinari, la considerazione della connotazione opportunistica dell'infezione da *Streptococcus suis*, che è innegabilmente favorita da situazioni, scelte ed errori nella gestione delle rimonte e delle sale parto, ma anche nella programmazione dei tempi e dei flussi di svezzamento.

In questo studio, abbiamo individuato e verificato le correlazioni tra ordine di parto ed effettiva incidenza delle manifestazioni cliniche chiaramente riportabili alla streptococcosi (artrite tarsica in sala parto e meningite in sala parto e svezzamento), mettendo in evidenza anche il maggiore impiego dei trattamenti antibatterici nelle primipare.

La quantità di dati prodotta dalle nostre rilevazioni è oggettivamente enorme e gli stessi non sono stati ancora completamente gestiti e analizzati; altro e meglio sarà necessario fare, soprattutto considerando la possibilità di un rilievo longitudinale, che correli lo stato infettivo e immunitario della scrofa (primipara o pluripara) con la "storia" sanitaria e produttiva dei

suini derivati. Nel frattempo, crediamo di aver indicato e applicato un nuovo approccio “metodologico” per la valutazione dell’effettivo “condizionamento gestionale” della malattia streptococcica; la sua utilità in prospettiva di controllo e prevenzione del problema, nella quale fermamente crediamo e che costituisce l’obiettivo finale del nostro lavoro, sarà l’oggetto degli studi che seguiranno questa prima fase.

BIBLIOGRAFIA

- Amass S., Stevenson G., Vyverberg B., et al. 2000. Swine health prod. 8: 217-219
- Dee s. & Corey M. 1993. “ The survival of *Streptococcus suis* on farm and veterinary equipment”. Swine health and Production – volume1 . number 1. 1993.
- Gottschalk M. 1999. *Streptococcus suis*: an update. American Association of Swine Practitioner Congress. 1999
- Gottschalk M., Higgins R., Quessy S. (1999). Dilemma of the virulence of *Streptococcus suis*. Journal of Clinical Microbiology. 37: 362-366.
- Gottschalk M., Segura M. (2000). The pathogenesis of the meningitis caused by *Streptococcus suis*: the unresolved question. Vet. Microbiology. 76: 259-272
- Gottschalk M. (2009). Review on *Streptococcus suis* infection in pigs and the importance of the agent as a cause of human infection. Acta Scientiae Veterinariae. 37 (1): 73s79.
- Martelli et al.(2013). Le patologie del maiale. Point Veterinaire Italie. Vittorio Sala: Streptococchi. Pagg 551-562.
- Papatsiros V.G., Vourvidis D., Tzitzis A.A., Meichanetsidis P.S., Stougiou D., Mintza D., Papaioannou P.S. (2011). *Streptococcus suis*: an important zoonotic pathogen for human – prevention aspect.” Veterinary World. 4 (5): 216-221.
- Reams R.Y., Glickman L.T., Harrington D., Thacker L., Bowersock T.L. (1994). *Streptococcus suis* infection in swine: a retrospective study of 256 cases. J. Vet. Diagn. Invest. 6: 326-334.
- Sala V., Beghian M., Piccinini R. (1990). Control of *Str. suis* type 2 pathologies by long acting amoxycillin in Italian swine herds” Proceedings of the 11th I.P.V.S. Congress. (Lausanne. 1990). pag. 189.
- Sala V., Gusmara C. (1997). Patologie da *Streptococcus suis*: un problema di attualità”. Summa.14 (7): 57-61.
- Sala V., Gusmara C. (2001). *Streptococcus suis* negli scarti di produzione. Summa. 18 (6): 49-52.
- Sala V., Leoni S. (2000). Patogenicità di *Streptococcus suis* in rapporto alla forma clinica di provenienza. Summa. 17 (2): 41-44.
- Sala V., Antonini M., Vischi O., Ansuini A., Guadagnini P., Conedera G., Fabbi M., Perini S. (1996). Distribution of capsular types and hemolysin production of *Sreptococcus suis* isolates in northern Italy. Proceedings of the 14th I.P.V.S. Congress (Bologna). pag. 307.
- Sala V., Antonini M., Carli S., Fantini M. (1999). Modificazioni dell’antibiotico-sensibilità di *Streptococcus suis* in Italia” O.D.V. 3: 61-65.
- Staats J.J., Feder I., Okwumabua O., Chengappa M.M. (1997). *Streptococcus suis*: past and present. Veterinary Research Communications. 21: 381-407.

STUDIO DELL'EPIDEMIOLOGIA DI *STREPTOCOCCUS SUI*S (MEDIANTE UTILIZZO DI SIEROTIPIZZAZIONE E DETERMINAZIONE DELLA PRESENZA DI FATTORI DI VIRULENZA) E DELLA RESISTENZA ANTIMICROBICA (AMR) IN UNA FILIERA PRODUTTIVA ITALIANA

***STREPTOCOCCUS SUI*S EPIDEMIOLOGY (USING SEROTYPING AND PRESENCE OF VIRULENCE FACTORS) AND AMR (ANTIMICROBIAL RESISTANCE) IN A LARGE PIG PRODUCTION SYSTEM IN ITALY**

SANDRI G. ¹, GIOVANARDI D. ², PESENTE P. ², ROSSI G. ²

¹ Agricola Tre Valli/Gruppo Veronesi ; ² Laboratorio Tre Valli/Gruppo Veronesi

Parole chiave: *Streptococcus suis*, fattori di virulenza, patotipo, multiplex PCR, antibioticosensibilità
Key words: *Streptococcus suis*, virulence factors, pathotype, multiplex PCR, antimicrobial sensitivity

Riassunto

Streptococcus suis è uno dei patogeni batterici che più frequentemente induce forme cliniche nella fase del post svezzamento. Sebbene ampiamente diffuso e presente al livello mondiale con oltre trenta sierotipi diversi, solo alcuni sierotipi sono responsabili di forme cliniche quali meningite, setticemia e artrite. Per evidenziare se e quali fossero i sierotipi presenti all'interno delle filiere di un sistema di produzione integrato è stato fatto uno studio della durata di quattro anni che ha catalogato e messo in correlazione origine dei casi, quadri clinici, risultati batteriologici, presenza di fattori di virulenza e sensibilità agli antimicrobici. Dall'analisi dei dati raccolti emerge che il tipo capsulare più frequentemente isolato è il 9, seguito dall' 1/2 . La maggior parte degli isolati ha mostrato un profilo Arc/mrp/Sly + o comunque ha confermato la presenza di uno o più fattori di virulenza. Non è invece stato possibile stabilire una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra e inter filiera. Il monitoraggio della sensibilità agli antibatterici negli ultimi 13 anni ha evidenziato come gli antibiotici betalattamici abbiano mantenuto nel tempo un ottimo livello di sensibilità confermandoli come molecole di prima scelta per un intervento terapeutico.

Abstract

Streptococcus suis is definitely one of the most frequently isolated bacteria inducing severe clinical pictures in the post weaning stage. Although present worldwide with over 30 different serotypes, only few among these are able to induce clinical pictures like meningitis, septicemia and arthritis. In order to understand if and which were the serotypes possibly circulating in the different flows of a large integrated production system a study was carried over during a four years long correlating the origin of the isolates, the clinical pictures, bacteriology results, presence of virulence factors and antimicrobial sensitivity. Collected data confirm that the most frequently isolate is type 9 followed by type 1/2. Most of the isolates showed a Arc/mrp/Sly + profile or anyhow confirmed the presence of at least one or more virulence factors. On the contrary it was impossible to establish a one way correlation with a certain serotype along a determinate flow or even among different flows. Monitoring antimicrobial sensitivity during the last 13 years highlighted how betalactamic antibiotics maintained a very high sensitivity in time confirming these molecules as first choice for therapy.

INTRODUZIONE

Anche se *Streptococcus suis* può essere responsabile di problemi clinici durante tutta la vita produttiva del suino è il secondo patogeno più frequentemente isolato nei suinetti svezzati dopo ETEC *E. coli*. A livello mondiale sono stati descritti/segnalati fino a trenta differenti tipi capsulari di *Streptococcus suis* ma solo un numero limitato di questi causano problemi clinici significativi. Lo scopo di questo studio è descrivere i risultati di un'indagine epidemiologica condotta nelle filiere di un grande sistema produttivo multisede italiano, durata quattro anni, mostrando la distribuzione verticale dei sierotipi e patotipi. Il termine patotipo si riferisce alla variante di un particolare microrganismo, capace di indurre forme cliniche, differenziabile da altri ceppi della propria specie sulla base dei suoi marker molecolari e virulenza. Nell'ambito dello studio è stata anche analizzata l'evoluzione nel tempo del pattern dell'Antibiotico Sensibilità nei confronti di *Streptococcus suis*.

MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra il 2010 e il 2014, per la ricerca di *Streptococcus suis*, sono stati esaminati cervello, fegato, milza, polmone e articolazioni di suini di età compresa tra pochi giorni di vita e 100 giorni provenienti da casi clinici manifestatisi principalmente durante il periodo post-svezzamento (80,7%), sottoscrofa (17,5%) e, anche se più raramente, all'ingrasso (1,8%). I visceri selezionati sono stati analizzati in piastre agar (Blood Agar Base, OXOID, Themofisher Scientific, UK) addizionate di sangue di montone al 3%. Dopo inoculo le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. Durante la lettura delle piastre di agar sangue, colonie sospette di *Streptococcus suis*, selezionate sulla base della loro morfologia e loro emolisi viridante (alpha- emolisi), sono state trapiantate su agar sangue per ulteriori analisi. Le colonie, con morfologia ed emolisi non tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a indagini biochimiche utilizzando la galleria miniaturizzata API Rapid ID 32 STREPT (bioMérieux, Francia). Le colonie che non presentavano profilo biochimico corrispondente a quello di *Streptococcus suis* sono state eliminate. Tra le colonie isolate, solamente quelle presentanti morfologia ed emolisi tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a test di sieroagglutinazione rapida su vetrino utilizzando sei antisieri commerciali (*Streptococcus suis* type serum 1, 2, 4, 7, 9, 12 – SSI Diagnostica, Statens Serum Institute, Danimarca).

Per verificare la sensibilità antibiotica di *Streptococcus suis* le colonie isolate, con morfologia ed emolisi tipiche, sono state sottoposte ad antibiogramma, utilizzando il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) nei confronti di diversi principi attivi. Tra questi quelli più utilizzati sono Ampicillina (OXOID), Amoxicillina (OXOID), Amoxicillina + Ac. clavulanico (OXOID) e Ceftiofur (OXOID). Altri antibiotici, meno o non utilizzati per il trattamento specifico delle patologie da Streptococco, quali Trimethoprim-sulfametossazolo (OXOID), Lincomicina (OXOID), Florfenicolo (Merck), Enrofloxacin (Bayer) e Doxyciclina (OXOID) sono stati egualmente testati per verificare un'eventuale variazione di sensibilità nel tempo, seppur in un arco temporale più breve. Dopo inoculo di colonie isolate in Mueller-Hinton brodo (OXOID) e incubazione a 37 ± 1 °C per quattro ore in condizioni di aerobiosi, la sospensione batterica è stata diluita per raggiungere la torbidità di 0,5 McFarland. Con tale sospensione, sono state inoculate piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionate di sangue di montone al 3% ed incubate, in condizioni di aerobiosi, a 37 ± 1 °C per 4 ore. La valutazione degli aloni d'inibizione - così come la loro interpretazione (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) - è stata eseguita da lettore computerizzato SIRSCAN micro (I2A, Francia).

Gli isolati di *S. suis* sono stati analizzati in multiplex-PCR per la ricerca dei geni correlati

alla produzione di fattori di virulenza. In particolare sono stati ricercati i geni codificanti i polisaccaridi della capula *cps1* (per i sierotipi 1 e 14), *cps2* (per i sierotipi 2 e 1/2), *cps7* (per il sierotipo 7), *cps9* (per i sierotipo 9), i geni per la proteina EF e le sue varianti (*epf*, *epf**), i geni per la proteina suilisina (*sly*), i geni per la proteina MRP e le sue varianti (*mrp*, *mrp** and *mrp^s*), e il gene per la proteina arginina deaminasi (*arc*).

Il DNA batterico è stato estratto da 2 ml di brodo cultura utilizzando il kit “NucleoSpin 96 Tissue” kit (Macherey-Nagel) automatizzato sul biorobot “Microlab Starlets” (Hamilton). L’analisi di PCR è stata eseguita utilizzando il metodo di Silva *et al.* 2006, con la master mix “Multiplex PCR kit” (Qiagen) e la corsa è stata eseguita sul termociclatore “GeneAmp PCR System 9700 Thermocycler” (Life Technologies). Gli ampliconi ottenuti sono infine stati analizzati in elettroforesi capillare con lo strumento “Qiaxcel multicapillary electrophoresis system” (Qiagen). La corsa elettroforetica è stata normalizzata con il marcatore di allineamento “Alignment Marker 50 bp/3 kb”, mentre la corrispondenza del peso delle bande ottenute con quello atteso è stata confermata con l’utilizzo del “DNA Molecular Weight Marker VIII” (Roche).

RISULTATI

Solo nove dei 57 isolati provenivano dalle scrofaie (siti 1) mentre tutti rimanenti, eccetto uno, provenivano da suini svezzati evidenziando come proprio questa sia la fase produttiva maggiormente colpita da questa patologia.

Nell’ 80,7% dei casi inviati per indagini di laboratorio *S. suis* è stato isolato da più organi - confermando quindi la forma setticemica - mentre nel 19,3% dei casi è stato isolato esclusivamente dal cervello (meningite). *S. suis* è stato isolato dai polmoni dei soggetti inviati al Laboratorio solo in 11 casi su 57 (19,3%) confermando come, almeno in queste fasi produttive, non sia un patogeno tipicamente respiratorio. Il sierotipo/tipo capsulare 9 è risultato quello più frequentemente isolato (31% dei casi). Il 50% degli isolati di sierotipo 9 hanno mostrato un profilo (patotipo) Arc/mrp/Sly + . Il secondo isolato più comune (22% dei casi) è stato il sierotipo 1 / 2, mentre il terzo è stato il sierotipo 4. Otto ceppi, pari al 14%, sono risultati non tipizzabili sia tramite PCR sia con gli antisieri specifici a disposizione del Laboratorio.

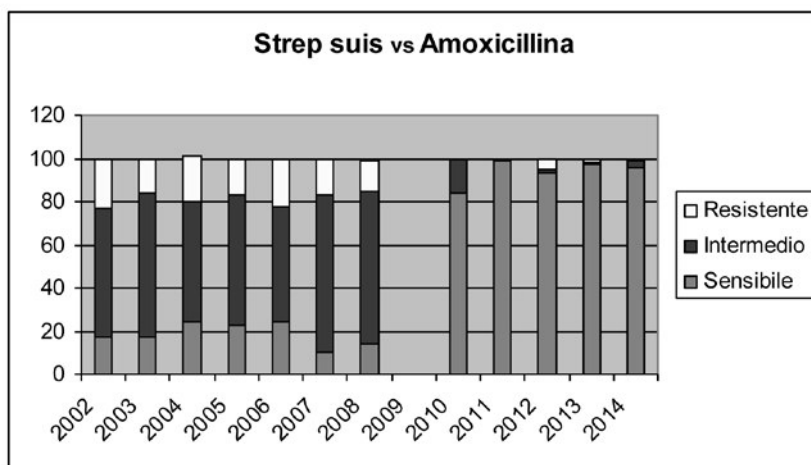
Tab.1/ Table 1

	N° casi	Correlazione con sieroagglutinazione	Arc-Mrp-Sly +
Sierotipo 1	5	3/5	40%
Sierotipo 2	5	3/5	40%
Sierotipo 1/2	13		38,4%
Sierotipo 4	6	Solo sieroagglutin.	50%
Sierotipo 7	1		
Sierotipo 9	18	17/18	50%
Sierotipo 11	1		
Non tipizzabili (NT)	8		12,5%

Ventidue isolati (38,6%), indipendentemente dal sierotipo di appartenenza, avevano un profilo completo Arc/mrp/Sly +.

E' interessante notare come I ceppi di *S. suis* isolati nel corso di questa indagine – così come quasi tutti quelli isolati dal nostro Laboratorio nel corso degli ultimi tredici anni – mostrino una limitatissima resistenza verso gli antibiotici Betalattamici tipo ampicillina (86-98% sensibilità) e amoxicillina (95-100% sensibilità).

Graf. 1/graph.1



Al contrario si è evidenziata un'elevata percentuale di resistenza nei confronti dell'associazione sulfamidico+ trimethoprim (>90% resistenti) e anche nei confronti di lincomicina (85-92% resistente). Includendo anche i valori di sensibilità intermedia anche ceftiofur (cefalosporine 3° generazione) ha dimostrato di mantenere una buona sensibilità nel tempo.

DISCUSSIONE

La definizione di ceppi virulenti di *S. suis* è molto controversa. Uno degli approcci proposti per identificare i ceppi come virulenti consiste nella differenziazione per tipo capsulare (polisaccaridi capsulari) e nella successiva identificazione dei fattori di virulenza associati. Tra questi Arginin-deaminasiA (ArcA), la Muramidase released Protein (MRP, mrp) e l'emolisina/suilysina (SLY, sly) sono quelli più comunemente accettati. E' allora possibile fare un'associazione tra patotipo e patogenicità intesa come espressione clinica dell'infezione ? In base ai risultati di questa esperienza, che riteniamo significativa, seppur limitata nel tempo, possiamo dire che forme cliniche manifeste sono quasi sempre associate al rilevamento di alcuni o tutti i sopra citati fattori di virulenza. Solo in sette casi su 57 (12,3%) gli Streptococchi isolati non mostravano alcun fattore di virulenza tra quelli individuati dalla nostra PCR. Di questi sette isolati ben tre sono risultati non tipizzabili sia in PCR che con gli antisieri disponibili. E' invece difficile, almeno dal punto di vista statistico, dimostrare una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra filiera e tra le filiere. In tema di antibiotico sensibilità è incoraggiante vedere come i principi attivi più comunemente e frequentemente utilizzati siano rimasti "attivi" nel tempo.

CONCLUSIONI

Nonostante il sintomo clinico più frequentemente riportato sia la meningite, la grande maggioranza dei ceppi si è dimostrata in grado di essere molto invasiva essendo questi stati isolati da diversi organi/distretti anche quando non tutti i fattori di virulenza sono risultati presenti. Poiché nel tempo sono stati isolati sierotipi diversi nelle stesse filiere non è stato possibile dimostrare una correlazione univoca tra la scrofaia (sito 1) di origine e i rispettivi siti 2 in termini di sierotipo. Per poter efficacemente trattare i soggetti colpiti è fondamentale proseguire il monitoraggio nel tempo della sensibilità di *S. suis* nei confronti degli antibatterici, ma gli antibiotici betalattamici possono ancora essere considerati di prima scelta in caso di necessità. Le indicazioni emerse dalla nostra indagine rafforzano il nostro concetto di “diagnosi di filiera” almeno nel caso delle patologie causate da *Streptococcus* nella fase post svezzamento.

BIBLIOGRAFIA

Higgins R., Gottschalk M. “Streptococcal Diseases” in Diseases of Swine 8th Edition, Iowa State University Press

Baums CG. (2013) “Pathogenesis, diagnosis and prophylaxis of *Streptococcus suis* diseases” in: 19th Swine & Wine Meeting, Hamm-Kump, Germany, 25-27 October 2013

Silva L.M., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P. “Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR” *Vet Microbiol.* 2006 Jun 15;115(1-3):117-27.

Varela N.P., Gadbois P., Thibault C., Gottschalk M., Dick P., Wilson J. “Antimicrobial resistance and prudent drug use for *Streptococcus suis*” *Anim Health Res Rev.* 2013 Jun;14(1):68-77.

PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA ASSOCIATI A *E. COLI* ISOLATI DA SUINI CON DIARREA POST SVEZZAMENTO (PWD) IN ITALIA

PREVALENCE OF VIRULENCE FACTORS ASSOCIATED WITH POST WEANING DIARRHOEA (PWD) IN PIGS IN ITALY

GIBELLINI M.², BONILAURI P.¹, GHERPELLI Y.¹, GIOVANARDI D.³,
MARZANI K.¹, TORRI D.¹, DOTTORI M.¹, FERRO P.², SCANDURRA S.²,
MAIOLI G.¹, HIDALGO A.⁴, LUPPI A.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER)*

²*Elanco Animal Health, Firenze, Italia.*

³*Laboratorio Tre Valli, Gruppo Veronesi, Italia.*

⁴*Elanco Animal Health, Basingstoke, UK.*

Parole chiave: PWD, ETEC, diarrea, F4, F18

Key words: PWD, ETEC, diarrhoea, F4, F18

Abstract

From 2012 to 2014, 159 *E. coli* isolates were obtained from diagnostic samples (rectal swabs, faeces and small intestine) collected from pigs with post weaning diarrhoea (PWD), belonging to 84 herds located in Northern Italy, using standardized bacteriological methods. To evaluate the prevalence of virulence factors, a multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) for F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F18, F41, STa, STb, LT and Stx2e genes was performed on *E. coli* isolates. The prevalence of fimbriae genes was: F4 (54,8%), F18 (33,3%) and F6 (1,2%). In 5 cases, the strains isolated harboured more than one fimbrial gene: F4+F18 (4,8%) and F5+F41 (1,2%). The prevalence of toxin genes was: LT (55,9%), STa (63,1%), STb (71,4%) and STx2e (9,5%). ETEC isolates were detected in 68 of the herds (80,9%), with 98,8% of them being haemolytic. ETEC-F4 were isolated in 57,6% of the outbreaks (39 out of 68), whilst 36,8% (25 out of 68) were classified as ETEC-F18. The two most common ETEC virotypes were F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22,1%).

This study confirms that ETEC-F4 is most commonly associated with PWD in Italy and the most prevalent virotype was F4, STb, LT.

Information about the prevalence of ETEC in cases of PWD is relevant when measures of control of the disease such as vaccination must be taken. Alternative approaches to antibiotic therapy are needed, since very high rates of antimicrobial resistance are reported in ETEC isolated from cases of PWD.

Riassunto

Nel periodo 2012 – 2014 159 ceppi di *E.coli* sono stati isolati da 84 allevamenti di suini localizzati nel nord Italia con patologia enterica riferibile a PWD. I ceppi isolati sono stati tipizzati utilizzando una metodica multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) per i geni codificanti le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e le tossine termostabili STa, STb, la tossina termolabile LT e la tossina cosiddetta shiga-like Stx2. In 68 focolai (80,9%) i ceppi di *E.coli* isolati sono stati classificati come ETEC e nel 99% dei casi un solo

ceppo era coinvolto nel focolaio di PWD. In generale la prevalenza dei geni codificanti per antigeni fimbriali nei ceppi di *E.coli* isolati è stata: F4 (54,8%), F18 (33,3%) and F6 (1,2%). In 5 casi, i ceppi isolati hanno presentato più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali: F4+F18 (4,8%) e F5+F41 (1,2%). La prevalenza dei geni codificanti per le tossine è risultata essere: LT (55,9%), STa (63,1%), STb (71,4%) e STx2e (9,5%). Il 57,6% degli ETEC isolati (39 focolai su 68) sono stati identificati come F4, mentre nel 36,8% dei casi (25 focolai su 68) gli ETEC isolati sono risultati essere F18. I due virotipi più frequenti sono risultati essere F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22,1%). Conoscere le cause della diarrea nel periodo del post-svezzamento è indispensabile per un corretto approccio nella scelta delle misure di controllo da adottare.

INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento sostenuta da *E.coli* (PWD) è una delle principali patologie dell'allevamento suino per le forti perdite economiche che ne derivano, causate dall'elevata mortalità all'interno dei gruppi colpiti e da ritardi di crescita nei soggetti che superano la fase acuta della malattia (Van Beers-Schreurs et al., 1992; Fairbrother et al., 2005). La stima delle perdite annuali dovute a PWD varierebbero da 40 a 314 euro/scrofa a seconda dalla gravità della malattia (Sjölund et al., 2014).

I focolai di PWD generalmente insorgono nella seconda settimana dallo svezzamento, dove la comparsa della diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa. I suini colpiti presentano generalmente anoressia o disoressia, feci diarroiche acquose giallastre, marcata disidratazione, perdita delle performance produttive e mortalità. La mortalità è variabile, può essere elevata raggiungendo talvolta percentuali del 25%.

La PWD è causata da ceppi di *E.coli* enterotossigeni (ETEC), che possiedono fattori di adesività che permettono l'aderenza del batterio alle cellule dell'intestino tenue e la capacità di produrre enterotossine che agiscono alterando l'omeostasi enterocitaria, causano un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD (Fairbrother et al., 2012).

I fattori di adesività, comunemente chiamati antigeni fimbriali, associati agli ETEC isolati da suini colpiti da PWD sono comunemente F4 (precedentemente chiamato K88) e F18, mentre molto meno frequentemente sono coinvolte altre adesine fimbriali, F5 (K99), F6 (987P) e F7 (F41) (Kwon et al., 2002; Frydendahl, 2002; Chen et al., 2004; Vu Khac et al., 2006). Le fimbrie F4 si suddividono in F4ab, F4ac, la variante maggiormente diffusa, e F4ad (Fairbrother et al., 2012) mentre le F18 possiedono due varianti antigeniche: F18ab associata, salvo rare eccezioni, alla malattia degli edemi e la variante F18ac agente della diarrea in post-svezzamento (Rippinger et al., 1995).

La patogenesi della diarrea è legata alla produzione di tossine termolabili (LT), termostabili (STa, STb) e enteroaggregative (EAST-1) che, attraverso il meccanismo patogenetico precedentemente descritto causano un aumento di acqua nel lume intestinale e conseguente diarrea nei suinetti colpiti (Fairbrother et al., 2005). La combinazione dei diversi fattori di virulenza va a determinare il virotipo.

La diagnosi di PWD inizia con la valutazione della diarrea e delle lesioni anatomopatologiche intestinali, passa dall'isolamento del patogeno attraverso metodiche batteriologiche standardizzate e si conclude con la sua tipizzazione. La maggior parte degli ETEC responsabili della PWD, se coltivati su agar sangue, determinano una evidente emolisi e pertanto questo fenomeno viene spesso utilizzato come criterio per una diagnosi preliminare. Nella routine diagnostica, tuttavia, sia i ceppi emolitici, sia

quelli non emolitici (soprattutto quando questi ultimi vengono isolati da conclamate forme cliniche o lesioni intestinali compatibili con PWD), dovrebbero essere sottoposti a conferma e tipizzazione.

L'agglutinazione su vetrino è un metodo rapido ed economico utilizzato in molti laboratori per l'identificazione di ETEC F4. Attualmente la genotipizzazione dei ceppi isolati, impiegando metodiche PCR per l'evidenziazione di geni codificanti diversi fattori di virulenza come le fimbrie (F4, F5, F6, F18, F41) e le tossine (Sta, Stb, LT, EAST1), è utilizzata sempre più frequentemente per una completa tipizzazione degli ETEC.

I dati relativi alla prevalenza dei fattori di virulenza (fimbrie e adesine) dei ceppi di ETEC responsabili di focolai di PWD nei diversi paesi produttori di suini sono scarsi, generalmente non differenziano tra casi di diarrea pre e post-svezzamento o non fanno distinzione tra ceppi causa di PWD o malattia degli edemi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di determinare la prevalenza dei diversi antigeni fimbriali di ceppi enterotossigenici di *E.coli* responsabili di focolai di PWD negli anni 2012-2014.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nel periodo 2012 - 2014 84 allevamenti di suini localizzati nel nord Italia con patologia enterica riferibile a PWD sono stati campionati e sottoposti a conferma di laboratorio. A questo scopo da ogni allevamento sono stati campionati almeno tre suini con sintomatologia acuta compatibile con PWD (diarrea entro 2-3 settimane dallo svezzamento) e il materiale patologico prelevato (feci, tamponi rettali, intestini o carcasse di suini deceduti) è stato conferito presso l'IZSLER per indagini di laboratorio.

Metodiche di laboratorio

I campioni conferiti al laboratorio, in caso si trattasse di carcasse di suini deceduti o intestini sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico seguendo metodiche standardizzate e a prelievo di materiale patologico. Quest'ultimo, le feci e i tamponi rettali conferiti sono stati routinariamente seminati su terreno Agar sangue al 5% e Gassner agar. Le piastre sono state incubate per 12-18 ore a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$. Per ogni piastra è stata identificata una colonia di *E.coli*, attraverso una valutazione della morfologia, seguita da conferma attraverso metodi biochimici standardizzati. Dopo la conferma il ceppo isolato è stato testato utilizzando una metodica multiplex PCR (Casey and Bosworth, 2009) per i geni codificati le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41, le tossine termostabili Sta, Stb, la tossina termolabile LT e la tossina cosiddetta shiga-like Stx2, responsabile delle tipiche lesioni anatomopatologiche osservate nella malattia degli edemi (Tabella 1).

Tabella 1. Sequenze dei primers utilizzati per l'identificazione dei geni codificanti per le tossine e fimbrie.

Table 1. DNA Sequence of PCR primers for fimbrial and toxin genes.

Fattore di virulenza	Primer	Dimensioni del prodotto PCR
STb	TGCCTATGCATCTACACAAT CTCCAGCAGTACCATCTCTA	113
STa	A ACTGA ATCACTTGACTCTT TTAATAACATCCAGCACAGG	158
F5	AATACTT'GTTTCAGGGAGAAA AACTTTGTGGTTAACTTCCT	230
LT	GGCGTTACTATCCTCTCTAT TGGTCTCGGTCAG ATATGT	272
F18	TGGTAACGTATCAGCAACTA ACTTACAGTGCTATTTCGACG	313
F6	AAGTTACTGCCAGTCTATGC GTAACCTCCACC'GTTTGTATC	409
F4	GTTGGTACAGGTCTTAATGG GAATCTGTCCGAGAATATCA	499
F41	AGTATCTGGTTCAGTGATGG CCACTATAAGAGGTTGAAGC	612
Stx2	AATAGTATACGGACAGCGAT TCTGACATTCTGGTTGACTC	733

Sessantaquattro ceppi di *E.coli* isolati in questo studio e classificati come ETEC sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 10 antibiotici: apramicina (15 µg), cefquinome (30 µg), enrofloxacin (5 µg), eritromicina (15 µg), florfenicolo (30 µg), tiamfenicolo (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg) e trimethoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg). L'antibiogramma secondo Kirby Bauer è stato eseguito seguendo un metodo di prova interno basato su standards noti forniti dal Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI, 2002 e 2008) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute fornite dal CLSI (2002 e 2008) e dal Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM, 2010). Gli antibiogrammi hanno fornito pertanto, per ogni antibiotico impiegato, un risultato qualitativo espresso come "S, R o I" a seconda che il ceppo batterico in esame abbia mostrato rispettivamente sensibilità, resistenza o una condizione intermedia tra le prime due, ad una determinata molecola antibiotica.

Valutazione dei risultati della genotipizzazione dei ceppi di *E.coli*

I risultati ottenuti dalla genotipizzazione dei ceppi di *E.coli* isolati da ogni focolaio sono stati utilizzati per il calcolo della prevalenza dei fattori di virulenza e del virotipo. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti più isolati appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico ceppo nel calcolo della prevalenza. Ai fini del presente

lavoro sono stati considerati come ETEC i ceppi presentanti i geni codificanti sia per le fimbrie, sia per le tossine.

RISULTATI

Nel periodo 2012-2014 sono stati isolati 159 ceppi di *E.coli* da 84 focolai di diarrea post svezzamento con caratteri clinici compatibili con PWD, occorsi in altrettanti allevamenti suini. In 68 focolai (80.9%) i ceppi di *E.coli* isolati sono stati classificati come ETEC e di questi il 98.8% presentava attività emolitica quando coltivati su agar sangue. Nel 99% un solo ceppo era coinvolto nel focolaio di PWD. In 16 allevamenti (19%) i ceppi di *E.coli* isolati erano negativi per la presenza di geni codificanti gli antigeni fimbriali o le tossine indagati con la metodica sopraccitata.

In generale la prevalenza dei geni codificanti per antigeni fimbriali nei ceppi di *E.coli* isolati è stata: F4 (54.8%), F18 (33.3%) and F6 (1.2%). In 5 casi, i ceppi isolati hanno presentato più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali: F4+F18 (4.8%) e F5+F41 (1.19%). La prevalenza dei geni codificanti per le tossine è risultata essere: LT (55.9%), STa (63.1%), STb (71.4%) e STx2e (9.5%).

Il 57.6% degli ETEC isolati (39 focolai su 68) sono stati identificati come F4, mentre nel 36.8% dei casi (25 focolai su 68) gli ETEC isolati sono risultati essere F18. In 4 casi (5.9%) sono stati identificati ETEC presentanti sia geni codificanti per le fimbrie F4 sia F18. I due virotipi più frequenti sono risultati essere F4, STb, LT (25%) and F4, STa, STb, LT (22.1%) (Tabella 2).

Tabella 2. Elenco e frequenza dei virotipi di ETEC isolati.

Table 2. Frequency of ETEC virotypes isolated.

VIROTIPI ETEC	N	%
F4 Sta	2	2,9
F4 Sta Stb	3	4,4
F4 Sta Stb LT	15	22,1
F4 Stb	2	2,9
F4 Stb LT	17	25
F4 F18 Sta	1	1,5
F4 F18 Sta LT	1	1,5
F4 F18 Sta Stb LT	2	2,9
F18 Sta	5	7,3
F18 Sta LT	2	2,9
F18 Sta Stb	3	4,4
F18 Sta Stb LT	7	10,3
F18 Sta Stb Stx2e	8	11,8
TOTALE	68	100

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati nei confronti dei 64 ceppi identificati come ETEC sono riportati in tabella 3.

Tabella 3: Sensibilità antibiotica di 64 ceppi di *E.coli* classificati come ETEC.

Table 3: Susceptibility of 64 strains of *E.coli* classified as ETEC to selected antimicrobials.

Antibiotico	% di ceppi resistenti	% di ceppi intermedi	% di ceppi sensibili
Apramicina	62,5	26,6	10,9
Cefquinome	18,8	28,1	53,1
Enrofloxacin	9,4	42,2	48,4
Eritromicina	98,4	1,6	0,0
Florfenicolo	34,4	23,4	42,2
Flumequina	10,9	54,7	34,4
Gentamicina	64,1	6,3	29,6
Tetraciclina	92,2	0,0	7,8
Tiamfenicolo	78,1	20,3	1,6
Trimetoprim + Sulfonamidi	73,4	6,3	20,3

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il primo punto che merita un breve approfondimento riguarda l'importanza della conferma di laboratorio dei casi presunti di PWD da ETEC. Questa costituisce un passaggio fondamentale nella diagnosi di colibacillosi ed è resa piuttosto semplice dalla facilità con cui *E.coli* può essere coltivato *in vitro* e dal fatto che in caso di patologia conclamata il patogeno raggiunge concentrazioni molto elevate sovrastando la flora batterica commensale. Quello che si verifica è una sorta di proliferazione clonale del ceppo patogeno coinvolto, come confermato dai risultati poc'anzi esposti, dove nel 99% dei focolai di PWD indagati, un solo ceppo di *E.coli* enterotossigeno era coinvolto. La semina da materiale patologico direttamente su agar sangue permette una prima valutazione sulle caratteristiche di patogenicità del ceppo isolato, essendo la maggior parte dei ceppi ETEC emolitici, come dimostrato anche nel presente lavoro dove questo è stato confermato nel 98.8% dei casi. La successiva valutazione dei fattori di adesività e delle tossine attraverso metodi sierologici o biomolecolari risulta conclusiva nel confermare l'appartenenza del ceppo in esame ad un determinato patotipo (ETEC, EDEC ecc.) e virotipo.

I risultati ottenuti nel presente studio confermano l'importanza degli ETEC F4 ed F18 come causa di PWD nel suino. Il dato di prevalenza ottenuto, per quanto riguarda i diversi fattori di virulenza valutati, apporta nuove informazioni sui ceppi di *E.coli* causa

di focolai di colibacillosi enterica nel suino in Italia e fornisce la possibilità di eseguire valutazioni comparative con i risultati ottenuti da altri autori in Europa e in altri paesi non europei importanti produttori di suini (Tabella 4).

Tabella 4. Prevalenza dei fattori di virulenza riportata in studi condotti in diversi Paesi su ceppi di *E.coli* isolati da casi di PWD.

Table 4. Prevalence of virulence factors of *E.coli* isolated in different countries from cases of PWD.

Paese	F4 %	F18 %	STa %	STb %	LT %	Bibliografia
Danimarca	48.3	34.5	28.6	83.7	66.5	Frydendahl, 2002
Polonia	46.8	22.6	93.5	67.7	33.9	Osek, 2000
Ungheria	61	-	-	-	-	Nagy et al., 1990
Slovacchia	19	35	26	46	20	Vu Khac et al., 2006
USA	64.6	34.3	27.4	72.6	57.7	Zhang et al., 2006
Brasile	43.5	39.1	80.4	82.6	54.3	Moreno et al., 2014
Australia	37.5	46.9	68.8	81.3	37.5	Chapman et al., 2006
Korea	20.1	50.7	28.5	35.4	37.5	Byun et al., 2008
Italia	54.8	33.3	63.1	71.4	55.9	Questo studio

I risultati ottenuti nel presente studio confermano l'elevata prevalenza di *E.coli* F4 in casi di PWD nel suino in Italia in accordo con quanto descritto da Luppi et al. nel 2012. Questo risultato si trova in accordo con quanto osservato in diversi studi condotti sull'argomento in Danimarca, Polonia, Ungheria, USA e Brasile. In altri paesi, tuttavia è stata segnalata una maggior incidenza di ceppi F18 in casi di PWD come ad esempio in Slovacchia, Australia e Korea.

Il virotipo prevalente è risultato essere F4 STb LT, in linea con quanto riportato da altri autori, facendo presupporre che a diverse combinazioni dei fattori di virulenza sia associata una diversa patogenicità, giustificando l'associazione e la prevalenza di questo virotipo con casi di PWD.

In 8 casi (11.8%) il virotipo è risultato essere F18 STa STb Stx2e, caratterizzato quindi da tossine tipiche degli ETEC (STa e STb) ma anche di ceppi EDEC (Stx2e) responsabili della malattia degli edemi. Nei casi specifici, tuttavia, il quadro clinico osservato era tipicamente di colibacillosi enterica, mentre mancavano completamente segni compatibili

con la malattia degli edemi. Ceppi che presentano un profilo che potremmo definire misto, come nel caso sopraindicato, si comportano generalmente come ETEC, come confermato dalla letteratura scientifica sull'argomento (Fairbrother et al., 2012).

Come descritto nei risultati, in 16 allevamenti (19%) i ceppi di *E.coli* isolati sono risultati negativi per la presenza di geni codificanti gli antigeni fimbriali o le tossine, indagati con la metodica sopracitata. Se da una parte è corretto non considerare questi ceppi come ETEC, l'isolamento da casi di PWD di ceppi di *E.coli* che possiedono geni codificanti per le fimbrie in assenza di geni codificanti per le tossine e viceversa, richiede ulteriori approfondimenti per una corretta comprensione del ruolo che questi ceppi possono avere nell'insorgenza della diarrea.

La valutazione dei risultati ottenuti dagli antibiotici impiegati ha permesso di evidenziare scarsa attività antibiotica di molecole come la tetraciclina, il tiamfenicolo, l'apramicina. Nessun ceppo è risultato essere sensibile nei confronti dell'eritromicina, molecola prototipo per i macrolidi (Tabella 3). La maggior percentuale di ceppi sensibili è stata evidenziata nei confronti del cefquinome (53,1%), cefalosporina di quarta generazione e dell'enrofloxacin (48,4%). Occorre sottolineare, a questo proposito, le misure intraprese da numerosi stati Europei per preservare queste molecole che sono considerate tra i cosiddetti *critical important antibiotics* per la loro importanza terapeutica nell'uomo. In diversi paesi, tra cui la Danimarca, la Francia, la Svezia e la Germania, per citarne alcuni, queste molecole sono state bandite o considerate farmaci antibiotici di terza scelta, da utilizzare solo ed esclusivamente quando non sussistono alternative terapeutiche al problema sanitario.

Il 42,2% dei ceppi è risultato sensibile al florfenicolo, molecola di relativa recente introduzione, mentre percentuali di sensibilità di poco superiori e di poco inferiori al 30% sono state registrate rispettivamente per flumequina e gentamicina.

Conoscere le cause della diarrea nel periodo del post-svezzamento è indispensabile per un corretto approccio nella scelta delle misure di controllo da adottare. In particolare, il fenomeno dell'antibiotico resistenza descritto in ceppi di *E.coli* causa di PWD nel suino e il richiamo ad un uso razionale del farmaco antibiotico, riportano all'urgenza di strumenti di controllo alternativi all'utilizzo dell'antibioticoterapia, come ad esempio la vaccinazione.

BIBLIOGRAFIA

Byun, J.W., Kim, H.Y., Jeon, B.Y., Lee, W.K., Lee, O.S., and Jung, B.Y. (2012). O-serogroup and virulence genes of *Escherichia coli* from the pigs suffered from pre- and post-weaning diarrhea. *Proceedings of the 22nd IPVS Congress, Jeju, Korea*, Volume 1, p 82.

Casey and Bosworth, (2009). Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia Coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigations* 21, 25-30.

Chapman T.A., Wu X.Y., Barchia I., Bettelheim K.A., Driesen S., Trott D., Wilson M., Chin J.J. (2006). Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Appl Environ Microbiol.* 72(7), 4782-95.

Chen, X., Gao, S., Jiao, X., and Liu, X.F. (2004). Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Eastern China. *Veterinary Microbiology* 103, 13-20.

Cheng, D., Sun, H., Xu, J., and Gao, S. (2006). PCR detection of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Veterinary Microbiology* 115, 320-328.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from animals. Approved standard, 3rd ed. CLSI document M31-A3. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

Fairbrother, J.M., et al., (2012). Colibacillosis. In: Disease of swine 10th Edition, 2012, p. 723-747.

Fairbrother, J.M., Nadeau, É., and Gyles, C.L. (2005). *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews* 6(1), 17-39.

Frydendahl, K. (2002). Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Veterinary Microbiology* 85, 169-182.

Kwon, D., Choi, C., Jung, T., Chung, H.K., Kim, J.P., Bae, S.S., Cho, W.S., Kim, J., and Chae, C. (2002). Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and STx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhea or edema disease in Korea. *The Veterinary Record* 150, 35-37.

Luppi, A., Bonilauri, P., Dottori, M., Gherpelli, Y., Biasi, G., Merialdi, G., Maioli, G., and Martelli, P. (2013). Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from swine in Italy. *Transboundary and Emerging Diseases* <http://dx.doi.org/10.1111/tbed.12081>.

Moreno M., Eckhardt O., Nadeau E., Ferreira Neto J.S., Felizardo M.R., Gomes V.T.M., Moreno A.M. (2014). Frequency of *E.coli* ETEC positive for K88 fimbriae (F4) in farms with post-weaning diarrhea in Brazil. *Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico*, Poster, p 16.

Nagy B., Casey T.A., Moon H.W. (1990). Phenotype and genotype of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Hungary. *J Clin Microbiol.* 28(4), 651-3.

Osek J. (2000). Clonal analysis of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with post-weaning diarrhoea by pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters* 186, 327-331.

Rippinger P., Bertschinger HU, Imberechts H., Nagy B., Sorg I., Stamm M., Wild P., Witting W., (1995). Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhea and from oedema disease. *Vet. Microbial* 45: 281-295.

Sjölund M., Zoric M., Wallgren P. (2014). Financial impact on pig production: gastrointestinal disorders. Proceedings of 6th European Symposium of Porcine Health and management (ESPHM), Sorrento, Italy, 7th-9th May 2014. P111.

Van Beers-Schreurs, H.M.G., Vellenga, L., Wensing, Th., and Breukink, H.J. (1992). The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: A review. *Veterinary Quarterly* 14(1), 29-34.

Vu Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., López, C., González, E.A., and Blanco, J. (2006). Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhea in Slovakia. *BMC Veterinary Research* 2, 10.

Zhang W., Zhao M., Ruesch L., Omot A., Francis D. 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary Microbiology* 123 145–152.

PRESENZA DI MRSA NEI PARTECIPANTI AL MEETING SIPAS 2014

MRSA IN THE PARTICIPANTS IN THE MEETING SIPAS 2014

DE FAVERI E.³, RIMOLDI S.², PAGANI C.², SALA V.¹

¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica – Università di Milano;

² Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche “L. Sacco” – Università di Milano

³ Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche –
Università di Milano

Parole chiave: MRSA, SIPAS 2014, suino, medico veterinario.

Key words. MRSA, SIPAS 2014, pig, veterinarian.

Riassunto

È stato attivato uno studio diagnostico-epidemiologico per verificare la localizzazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nei partecipanti al Meeting della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini. 117 partecipanti si sono sottoposti volontariamente a tampone nasale previo consenso informato. La ricerca selettiva ha permesso l'isolamento di 49 ceppi di MRSA; gli stessi sono stati processati in rep-PCR insieme a 17 isolamenti da tonsille provenienti da suini al macello. Gli isolamenti sono stati classificati in 6 pattern genomici; in due di questi sono presenti isolamenti provenienti dalle due specie. Uno dei pattern, in particolare comprende 29 ceppi di derivazione umana e 12 di derivazione suina, a conferma della capacità di infezione interspecifica di MRSA. Sono state infine elaborate alcune osservazioni di natura epidemiologica sui risultati e le stesse hanno generato considerazioni sul rischio biologico e sulla sua prevenzione.

Summary

A diagnostic study-epidemiological to verify the localization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in the participants at the Meeting of the Italian Society of Pathology and Farming of Pigs (SIPAS) has been activated. 117 participants have voluntarily placed a nasal swab prior informed consent. 49 strains of MRSA have been selectively isolated; they have been processed in rep-PCR together with 17 isolates from tonsils of the slaughterhouse pigs and have been classified into 6 genomic patterns. In two of these isolates from the two species are present. One of the pattern comprises 29 human-derived strains and 12 of swine origin, confirming the ability of interspecies infection of MRSA. Some observations on the results of epidemiological study were developed and same considerations on biological risk and its prevention were finally generated.

INTRODUZIONE

I primi ceppi resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati segnalati poco l'introduzione della meticillina nella pratica clinica, ma fino al 1980 la loro rilevanza è stata marginale (Brumfitt & Hamilton-Miller, 1989); solo in seguito, gli stafilococchi aurei meticillino-resistenti (MRSA) sono stati inseriti tra i principali agenti d'infezioni ospedaliere nel mondo. Oggi, negli Stati Uniti e in Europa fino al 30-50% degli stafilococchi aurei responsabili d'infezioni ospedaliere sono meticillino-resistenti (EARSS, 2008; NNIS, 2002) mentre nei Paesi Bassi e in Scandinavia i tassi di resistenza sono inferiori al 3%, grazie a piani di controllo e prevenzione correttamente gestiti.

In seguito, le popolazioni di MRSA sono state classificate in rapporto all'ambito di origine e/o di maggiore circolazione, distinguendo quindi *S. aureus* Healthcare-Acquired (HA), Community-Acquired (CA) e Livestock-Acquired (LA); sono questi ultimi che vedono coinvolti, con un ruolo epidemiologicamente decisivo, gli animali produttori di alimenti destinati all'uomo e che hanno generato l'ipotesi che la zootecnia intensiva possa essere, per la frequenza e l'intensità d'impiego dei trattamenti antibatterici, un ambito elettivo della selezione clonale delle antibiotico-resistenze.

La presenza di LA-MRSA nella produzione suinicola è oggi una certezza in molti Paesi e il suino è ormai considerato un potenziale serbatoio di trasmissione verso l'uomo e gli altri animali domestici; le sue più probabili funzioni epidemiologiche sarebbero la selezione delle varianti LA resistenti o addirittura la conservazione e la diffusione di quelle CA provenienti dall'uomo (Cui *et al.*, 2009; Wagenaar *et al.*, 2009).

Il contatto con i maiali è dunque ritenuto un fattore di rischio rilevante per la colonizzazione dell'uomo (Lewis *et al.*, 2008; Van Rijen *et al.*, 2008) al punto da assumere rilevanza socio-sanitaria in alcuni Paesi: in Olanda, la diffusione dei patotipi più frequenti nell'ambito zootecnico, in pratica nulla nel 2002, ha raggiunto il 21% nel 2006 (van Duijkeren *et al.*, 2008). Il fenomeno è certamente associato al contatto continuo con gli animali, poiché la colonizzazione riguarda particolarmente i veterinari, gli allevatori e i loro familiari.

Ciononostante, i fattori di rischio in suinicoltura sono stati indagati solo marginalmente: la continuità del lavoro a contatto con i suini è il principale, ma la qualità sanitaria del management può essere un fattore di amplificazione o riduzione.

Le indagini sulla localizzazione di MRSA nei veterinari hanno evidenziato una prevalenza relativamente elevata, sempre superiore a quella della popolazione generale; la mappatura dei cloni batterici ha confermato l'ipotesi dell'esposizione professionale in ippiatria e nell'ispezione degli alimenti di origine animale (Anderson *et al.*, 2008; Christianson *et al.*, 2007) mentre non esistono indicazioni certe nei veterinari occupati in suinicoltura.

Ciò ha motivato l'indagine di cui riportiamo i primi risultati in questa nota; il lavoro ha interessato i partecipanti al Meeting annuale della Società di Patologia e Allevamento dei Suini; per una maggiore comprensione epidemiologica, sono stati mappati gli isolamenti, allo scopo di verificare la presenza dello stesso genotipo nel suino e nell'uomo e quindi una circolazione interspecifica favorita dal sistema di produzione.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 117 partecipanti al Meeting annuale della Società di Patologia e Allevamento dei Suini, tenutosi a Montichiari (BS) nei giorni 27 e 28 marzo 2014. Il campione ha compreso Veterinari Aziendali, operanti nelle Aziende Sanitarie Locali e negli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, professionisti operanti per conto di Companies commerciali del settore suinicolo e tecnici aziendali. Il prelievo è avvenuto, previo consenso informato, mediante tampone nasale monolaterale.

Le procedure di campionamento sono state eseguite in osservanza dell'articolo 13 del Decreto Legislativo n° 106 del 30 giugno 2006 (Codice in materia di protezione dei dati personali); ogni individuo ha sottoscritto due moduli, fornendo il proprio consenso informato alla procedura e al trattamento dei dati personali. Il progetto è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università degli Studi di Milano.

Tutti i tamponi nasali sono stati eseguiti mediante tampone sterile monouso con terreno di trasporto tipo Ames W/OCH (Oxoid Italia); la manovra è stata eseguita in modo asettico e

non traumatico, evitando qualsiasi contatto contaminante. I tamponi sono stati immediatamente refrigerati (4-8°C) e in queste condizioni immediatamente trasportati al laboratorio d'analisi. Gli stipiti di derivazione suina appartengono invece alla collezione di MRSA del Laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica e sono stati isolati da tonsille prelevate a suini normalmente processati in stabilimenti di macellazione dell'Italia settentrionale.

La ricerca selettiva di MRSA è stata eseguita dal laboratorio di Patologia Suina del Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica dell'Università di Milano, mentre la successiva fase biomolecolare è stata condotta presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'Azienda Ospedaliera e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano. Qui di seguito sono schematizzate le fasi del processo.

Tamponi nasali

- Semina diretta in piastra su terreno MSA2 Gélose Chapman2 (Biomérieux, Francia) e su terreno selettivo Oxacillin-Salt Screen Agar (Biolife Italiana).
- Incubazione a 37°C per 18-24 ore.
- Lettura e interpretazione. MSA2: gli stafilococchi coagulasi-positivi (*S. aureus*) producono colonie con alone giallo, mentre i coagulasi-negativi hanno colonie bianche e non comportano viraggio del terreno Oxacillin-Salt Screen Agar: i ceppi di stafilococchi che crescono su questo terreno sono da considerare oxacillino-resistenti (la resistenza è estensibile alla meticillina e alla nafcillina). La valutazione crociata di crescita sui due terreni permette di individuare lo *S. aureus* meticillino resistente (MRSA)
- I ceppi isolati sono stati congelati a -20°C in glicerolo per una settimana e successivamente replicati su Tryptic Soy Agar (Biomérieux, Francia) prima dell'indagine biomolecolare.

Biologia molecolare

I ceppi meticillino-resistenti di *Staphylococcus aureus* sono stati analizzati mediante rep-PCR (DiversiLab System - Biomérieux, Francia) presso il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze dell'A.O e Polo Universitario "Luigi Sacco" di Milano; attraverso questa tecnica è possibile collocare gli isolamenti simili in pattern genotipici differenti tra loro.

La sua applicazione prevede tre passaggi successivi: l'estrazione del DNA batterico (tramite UltraClean® Microbial DNA Isolation kit - Biomérieux, Francia), la sua amplificazione mediante rep-PCR e il rilevamento dei DNA fingerprinting mediante elettroferogramma. Attraverso un software dedicato (DiversiLab - Biomérieux, Francia) si procede quindi alla comparazione dei fingerprint dei diversi campioni e alla loro catalogazione nei pattern.

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Batteriologia

I risultati disponibili per quanto riguarda gli isolamenti di MRSA dai partecipanti al Meeting 2014 sono stati organizzati in Tabella 1; essi riguardano gli isolamenti dai tamponi nasali degli stessi e sono stati confrontati con quelli di una precedente indagine sperimentale, condotta su un numero minore di medici veterinari e già pubblicata in ambito internazionale (De Faveri *et al.*, 2014).

La maggiore numerosità del campionamento ha verosimilmente determinato una maggiore presenza del microrganismo indagato e, infatti, la percentuale di soggetti positivi è passata dal 25% della prima indagine a un ben più rilevante 41,9%. Questo dato, lungi dall'essere ultimativo, può comunque essere considerato indicativo della rilevanza del problema.

	Totali	Negativi	<i>S. aureus</i> pos.	MRSA pos.
SIPAS 2014	117	53	15	49
Veterinari 2013	28	21	12	7

	Negativi (%)	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)
SIPAS 2014	45,3	12,8	41,9
Veterinari 2013	75	42,8	25

Tabella 1. Isolamenti di MRSA. Confronto tra due gruppi di campionamento.

Table 1. Isolation of MRSA. Comparison between two groups of sampling.

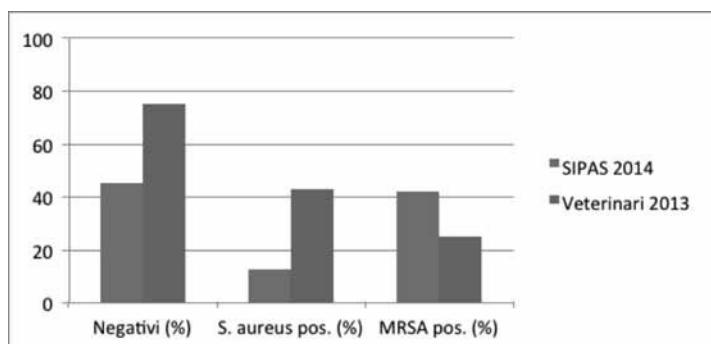


Figura 1. Valori percentuali nei due gruppi di campionamento.

Figure 1. Percentage values in the two sampling groups.

Pur considerando la relativa casualità del campione (i partecipanti al Meeting si sono sottoposti volontariamente al prelievo e quindi non è stato possibile stabilire preliminarmente la numerosità delle varie classi di età e di anni di occupazione in suinicoltura) alcune considerazioni possono essere proposte riguardo all'età e agli anni di attività nel settore suinicolo.

Sulla base dei dati di seguito organizzati (tabelle 2 e 3; figure 2 e 3) si può notare come MRSA sia diffusamente presente nei soggetti a vario titolo impiegati in suinicoltura e ciò avviene indipendentemente dall'età, dagli anni di occupazione nel settore, anche se esiste una corrispondenza tra il tempo effettivamente speso a stretto contatto con i suini, dato che i veterinari aziendali costituiscono il nucleo centrale delle positività.

Età (anni)	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)	Negativi (%)
25 - 35	3 (20)	8 (53,3)	4 (26,7)
36 -45	1 (3,7)	12 (46,3)	13 (50)
46 - 55	8 (18,2)	11 (25)	25 (56,8)
56 - 65	3 (9,4)	18 (56,2)	11 (34,4)

Tabella 2. Positività per *S. aureus* e MRSA. Età dei soggetti campionati.

Table 2. *S. aureus* and MRSA positivity. Age of the sampled subjects.

Anni di lavoro	<i>S. aureus</i> pos. (%)	MRSA pos. (%)	Negativi (%)
1 - 10	4 (18,1)	10 (45,5)	8 (36,4)
11 - 20	4 (11,4)	13 (37,2)	18 (51,4)
21 - 30	6 (14,6)	16 (39)	19 (46,4)
31 -40	1 (5,5)	10 (55,6)	7 (38,9)

Tabella 3. Positività per *S. aureus* e MRSA. Anni di lavoro dei soggetti campionati.

Table 3. *S. aureus* and MRSA positivity. Occupation years of the sampled subjects.

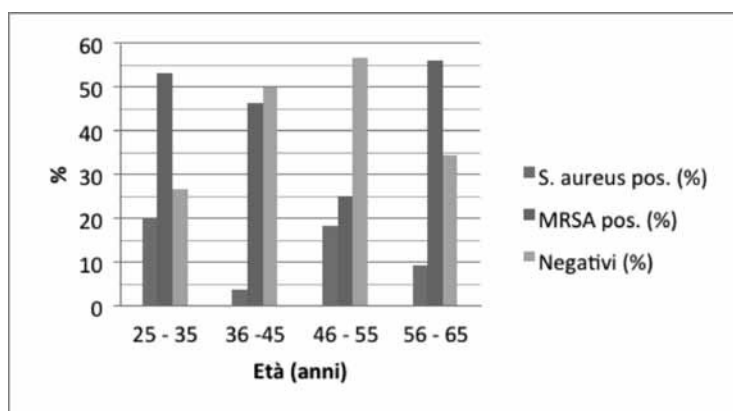


Figura 2. Valori percentuali nei gruppi rispetto all'età.

Figure 2. Percentage values in the groups with respect to the age.

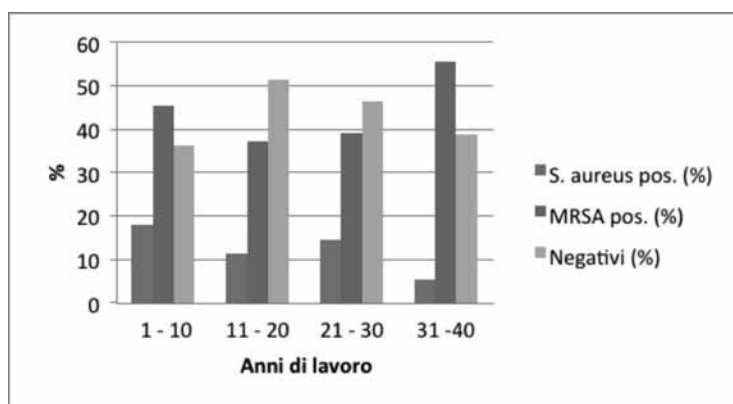


Figura 3. Valori percentuali nei gruppi rispetto agli anni di lavoro.

Figure 3. Percentage values in the groups with respect to the years of work.

Biologia molecolare

I risultati ottenuti mediante Diversilab sono organizzati in Tabella 4; sono stati sottoposti a rep-PCR 35 isolamenti da uomo e 17 da suino. Per maggiore chiarezza, ricordiamo qui che il sistema utilizzato permette di verificare il livello di similitudine del disegno genomico degli isolamenti, esprimendo una serie di “pattern” all’interno dei quali si collocano ceppi tra loro affini.

L’analisi mediante Diversilab li ha collocati in 6 pattern, all’interno dei quali si sono distribuiti come indicato in Tabella 2.

Pattern	N. isolamenti	Provenienza
1	1	Uomo
2	1	Uomo
3	1	Uomo
4	2	Uomo
5	6	1 Uomo, 5 Suino
6	41	29 Uomo, 12 Suino

Tabella 4. Suddivisione degli isolamenti nei pattern genomici.

Table 4. Breakdown of isolates among the genomic patterns.

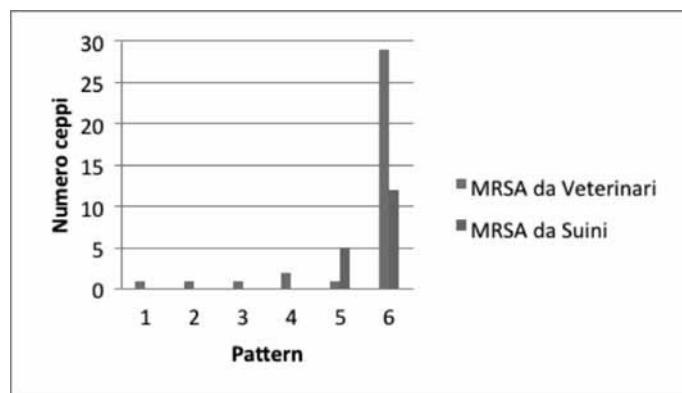


Figura 4. Pattern di identificazione. Rappresentazione grafica.

Figure 4. Identification patterns. Graphical representation.

È evidente come il pattern 6 sia quello numericamente più consistente, comprendendo ben 41 isolamenti; stipti di MRSA provenienti sia dal suino, sia dell’uomo sono inoltre presenti anche nel pattern 5.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

È prima di tutto chiaro che presenza e circolazione di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) nelle comunità umane e nella produzione zootecnica intensiva sono ormai

da considerare assodate e, per certi versi, inevitabili; nell'ambito che abbiamo considerato e sul quale stiamo ancora operando (quello dell'esposizione occupazionale in suinicoltura) la prevalenza delle localizzazioni silenti è particolarmente elevata e non è azzardato affermare che, in assenza di misure specifiche, l'incidenza del problema è destinata ad aumentare nel tempo.

Infatti, sul campione esaminato in questo studio sperimentale, costituito da 117 medici veterinari e operatori del settore, ben 49 degli stessi (corrispondenti al 41,9% del campione) si sono rivelati portatori oro-nasali di MRSA; questa percentuale di positività, sicuramente superiore a quella segnalate in altre categorie umane esposte, rappresenta il dato più preoccupante, soprattutto in prospettiva.

Inoltre ben 30 isolamenti da uomo (sui 35 esaminati) si collocano nei pattern 5 e 6, unitamente a isolamenti da suino, mentre nei restanti quattro pattern si trovano cinque stiptipi di esclusiva derivazione umana; il significato epidemiologico di questi risultati è facilmente comprensibile, in termini di specificità o inter-specificità dei singoli cloni batterici. Quest'ultima caratteristica ha un importante effetto di potenziamento della diffusione e della capacità patogena di qualsiasi microrganismo e MRSA si è progressivamente espresso in questa direzione.

A conferma di quanto detto, si consideri il disegno del pattern numero 6, che comprende ben 29 isolamenti di derivazione umana e 12 da suini, tutti genomicamente simili. Nel nostro lavoro, abbiamo già dimostrato la diffusione degli stessi anche ai familiari dei medici veterinari, verificando l'importanza epidemiologica dei c.d. Livestock-Acquired MRSA e le modalità di diffusione degli stessi alla popolazione non professionalmente esposta.

La correlazione tra esposizione professionale e rischio biologico è un altro aspetto riguardo al quale le indagini epidemiologiche su MRSA possono avere una funzione dirimente; di conseguenza, rivedere il concetto di rischio biologico alla luce della modificazione evolutiva delle antibiotico-resistenze e della progressiva selezione dei cloni batterici circolanti sarà indispensabile, soprattutto in certi ambiti occupazionali e la suinicoltura intensiva è certamente uno di questi.

Nel caso di MRSA e dei nostri congressisti, il rischio non è direttamente correlabile né all'età, né agli anni di esposizione: è verosimile che ciò dipenda più dalle capacità di diffusione e permanenza del microrganismo che dall'attività dei soggetti a rischio. Semmai si può osservare che gli operatori che hanno iniziato più recentemente la loro attività hanno dovuto affrontare ceppi batterici oggettivamente più potenti in ambito di antibiotico-resistenza di quanto era accaduto, a suo tempo, ai colleghi più anziani; ciò non è ovviamente dimostrabile in termini sperimentali, ma quanto via via osservato negli studi epidemiologici delle antibiotico-resistenze rende realisticamente accettabile questa indicazione.

Quanto fin qui disponibile in termini di risultati, consente di accrescere la convinzione riguardo all'ipotesi che ha motivato il progetto di cui questo studio rappresenta una fase di avanzamento, vale a dire l'esistenza di un percorso epidemiologico delle antibiotico-resistenze, lungo il quale la selezione avviene in ambito animale e l'esposizione professionale dell'uomo legata a specifici fattori di rischio può rappresentare la via d'accesso alla circolazione interumana. Proseguire in questa direzione è l'obiettivo più immediato, considerando che MRSA è, tra i batteri antibiotico-resistenti, la causa preponderante di mortalità, non più e non soltanto in ambito ospedaliero, come avveniva fino a pochi anni fa; a più lunga scadenza, le finalità sono la rivalutazione del rischio biologico in zootecnia e la proposta di misure preventive da applicare da parte delle categorie a rischio.

Gli operatori del settore suinicolo fanno certamente parte di queste e non solo nel caso di

MRSA: aumentare coscienza e conoscenza del problema è certamente il primo passaggio, ma provvedere all'elaborazione di linee guida condivise, è un obiettivo sempre più irrinunciabile.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson M.E., Lefebvre S.L., Weese J.S. (2008). Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet. Microbiol.* 129:410-417.
- Cui S., Li J., Hu C., Jin S., Li F., Guo Y., Ran L., Ma Y. (2009). Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:680-683.
- de Neeling A., van den Broek M., Spalburg E., van Santen-Verheuvél M., Dam-Deisz W., Boshuizen H., van de Giessen A., van Duijkeren E., Huijsdens X. (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122:366-372.
- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2014). Interspecific epidemiology of MRSA in pig. *Farming. J Infect Dis Ther.* 2:2 <http://dx.doi.org/10.4172/2332-0877.1000135>
- Denis O., Suetens C., Hallin M., Catry B., Ramboer I., Dispas M., Willems G., Gordts B., Butaye P., Struelens M.J. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 in swine farm personnel, Belgium. *Emerging Infect. Dis.* 15:1098-1101.
- Huijsdens X., van Dijke B., Spalburg E., van Santen-Verheuvél M., Heck M., Pluister G., Voss A., Wannet W., de Neeling A. (2006). Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 5:26.
- Khanna T., Friendship R., Dewey C., Weese J.S. (2007). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet. Microbiol.* 128:298-303.
- Lewis H.C., Mølbak K., Reese C., Aarestrup F.M., Selchau M., Sørup M., Skov R.L. (2008). Pigs as source of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cc398 infections in humans, Denmark. *Emerging. Infect. Dis.* 14:1383-1389.
- van Rijen M.M., Bosch T., Heck M.E., Kluytmans J.A. (2009). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemiology and transmission in a Dutch hospital. *J. Hosp. Infect.* 72:299-306.
- Voss A., Loeffen F., Bakker J., Klaassen C., Wulf M. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging. Infect. Dis.* 11:1965-1966.
- Wagenaar J.A., Yue H., Pritchard J., Broekhuizen-Stins M., Huijsdens X., Mevius D.J., Bosch T., van Duijkeren E. (2009). Unexpected sequence types in livestock associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): MRSA ST9 and a single locus variant of ST9 in pig farming in China. *Vet. Microbiol.* 139:405-409.

FOCOLAI DI DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED) IN 3 ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA

OUTBREAKS OF PORCINE EPIDEMIC DIARRHEA (PED) IN 3 FALLOW-TO-FINISH FARMS

GIACOMINI E., BONIOTTI MB., LAVAZZA A., LAZZARO M., PAPETTI A., SALOGNI C., GIOVANNINI S., LUPPI A., NIGRELLI A., ALBORALI G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"

Parole chiave: Suino, Diarrea epidemica del suino, PED

Key words: Pigs, Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PED

Riassunto

La Diarrea Epidemica del Suino (PED è l'acronimo di Porcine Epidemic Diarrhea) è una patologia sostenuta da coronavirus, caratterizzata da elevata morbidità e bassa mortalità, che si manifesta clinicamente con diarrea e disidratazione. Lo studio descrive tre episodi di PED che si sono verificati in aziende a ciclo chiuso della Lombardia segnalati nel volgere di pochi giorni a gennaio 2015. La sintomatologia era caratterizzata da anoressia e diarrea acquosa che ha interessato i riproduttori, i suinetti in sala parto e i suini in svezzamento, magronaggio ed ingrasso. Nei tre episodi la morbidità è stata del 80-100% e la mortalità assente in tutti i settori tranne nei suinetti sottoscrofa dove è stata del 25-50%. La diagnosi è stata fatta sia in PCR che in MAb-ELISA e l'analisi genomica preliminare dei ceppi identificati ha permesso di determinare che essi presentano un'elevata percentuale di identità con il ceppo USA OH851 considerato a moderata patogenicità. Le indagini epidemiologiche hanno evidenziato nei tre episodi la carenza di misure di biosicurezza esterna, in particolare riferite alla modalità di carico e scarico di animali vivi, della circolazione, pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto

Abstract

Porcine Epidemic Diarrhea (PED) is a disease caused by coronavirus characterized by high morbidity, low mortality and clinically by diarrhea and dehydration. The study describes three outbreaks of PED occurred in farrow-to-finish farms located in Lombardy, which occurred within few days on January 2015. The clinical signs in breeders, piglets growing and fattening pigs were characterized by anorexia and watery diarrhea. In the three PED outbreaks morbidity was 80-100% and mortality missing in all categories but piglets in which it was 25-50%. The diagnosis was performed by PCR and MAb-ELISA and preliminary genomic analysis of the strains showed a high percentage of identity with the mild strain USA OH851. Epidemiological investigations in the three outbreaks have shown failure of external biosecurity measures related to the animal loading and unloading, movement, cleaning and disinfection of vehicles.

INTRODUZIONE

La Diarrea Epidemica del Suino è una malattia virale causata da Coronavirus (Porcine Epidemic Diarrhoea Virus = PEDv) assimilabile clinicamente alla TGE (1). Si manifesta clinicamente con inappetenza e diarrea liquida e caratterizzata da elevata morbidità in tutte le

età (80-100%) e bassa mortalità, anche se nei suinetti sottoscrofa e in svezzamento la mortalità può in casi estremi arrivare al 50-100% (2,3). PEDv è un virus a singolo filamento di RNA del genere Alphacoronavirinae appartenente alla famiglia *Coronaviridae*. La PED è endemica fin dagli anni '90 in Europa e in Asia mentre nel 2013 è comparsa per la prima volta anche in America causando gravi danni economici al settore suinicolo. Negli USA la PEDv ha infettato approssimativamente il 50% degli allevamenti da riproduzione dal luglio 2013 al luglio 2014 (4,5). Successivamente è comparsa in Canada e, più recentemente, nel Centro e Sud America (Colombia, Repubblica Dominicana, Mexico, Perù etc). La PED è stata segnalata per la prima volta in Europa (UK) nel 1971 e in seguito in altri Paesi Europei. Negli anni novanta la PED è stata riscontrata con progressiva frequenza in Asia (Giappone, Korea, Filippine, Tailandia, Cina). Inoltre, in Cina sono stati segnalati diversi focolai nel 2010-2013 con un andamento epidemico ed elevata virulenza. In Europa negli anni '80 e '90 i casi clinici attribuibili al PEDV si sono ridotti a pochi casi isolati e la sieroprevalenza si è andata via via riducendo. In Italia è stata segnalata nei primi anni '90 ed è rimasta limitata a episodi sporadici sino al 2005-2006, anni in cui si è verificata un'epidemia caratterizzata da episodi importanti ad andamento altamente diffusivo (6). Negli ultimi mesi del 2014 la PED è stata segnalata in Germania, Olanda ed Ucraina ed i ceppi identificati come geneticamente correlati allo stipite USA OH851 a moderata patogenicità. L'approccio al controllo della malattia è basato sostanzialmente sulla diagnosi rapida, sull'applicazione di rigide misure di biosicurezza e sul *tracing back* dei movimenti di animali, prodotti e mangimi.

Lo studio descrive tre episodi di PED che si sono verificati in aziende da riproduzione a ciclo chiuso della Lombardia segnalati e confermati a distanza di pochi giorni nel mese di gennaio 2015, ponendo particolare attenzione alla sintomatologia, alla circolazione della malattia in azienda, al protocollo diagnostico applicato e alle misure di biosicurezza rilevate nei diversi focolai.

MATERIALI E METODI

Descrizione degli allevamenti sede di focolaio

Allevamento 1. L'azienda è sita in un'area a media densità suinicola e non sono presenti allevamenti suini nel raggio di 1 km. E' un allevamento di 350 riproduttori a ciclo chiuso con vendita di una parte dei suini da vita ad un peso di circa 35 kg. L'azienda è costituita da 5 capannoni; due sono destinati alla gestazione in box e in gabbia, al settore lattazione costituito da sale parto con 6 posti ciascuna. Adiacente a quest'ultima struttura sono posizionate 4 capannine esterne in vetroresina per ospitare gli animali in fase di svezzamento. I rimanenti 3 capannoni sono dedicati alla fase di magronaggio ed ingrasso con alimentazione a bagnato e presentano box della capienza di circa 20 soggetti, ventilazione naturale, e pavimentazione in cemento grigliato.

Allevamento 2. L'azienda è localizzata in un'area ad alta densità suinicola con la presenza di 4 allevamenti nel raggio di 1 km. E' un allevamento a ciclo chiuso con 1000 riproduttori. I fabbricati aziendali a disposizione sono complessivamente 10 dei quali 6 destinati al magronaggio ed ingrasso con alimentazione a bagnato, suddivisi in box di circa 40- 50 animali con possibilità di accesso ad un area esterna, ventilazione naturale e pavimento grigliato in cemento. I restanti capannoni sono adibiti alla gestazione in gabbia e in box, alle sale parto e allo svezzamento. In alcuni comparti è presente una promiscuità fra le diverse categorie.

Allevamento 3. L'azienda è situata in un'area ad alta densità suinicola e non sono presenti allevamenti nel raggio di 1 km. L'allevamento è a ciclo chiuso con 350 riproduttori ed è costituito da 5 capannoni. La fase di magronaggio e ingrasso occupa 3 capannoni suddivisi in box di 20 animali, con pavimento sia in grigliata che pieno, ventilazione naturale e alimentazione con

siero. Le altre 2 strutture sono destinate alla gestazione in box e gabbia e alle sale parto e svezzamento. Ogni sala parto contiene 10 posti e il settore svezzamento è composto da stanze da circa 100 soggetti suddivise in gabbiette con pavimento in grigliato in plastica.

Sintomatologia e misure di biosicurezza.

Le 3 aziende sede di focolaio sono state sottoposte a visita clinica ed indagine epidemiologica al fine di individuare i principali fattori di rischio e l'applicazione delle misure di biosicurezza. Le osservazioni cliniche hanno riguardato le principali caratteristiche della malattia quali inappetenza, diarrea liquida, percentuale di animali con diarrea liquida (0-5%, 6-20%, 21-50%, 51-100%) e la percentuale di mortalità. La sintomatologia è stata rilevata nei diversi settori presenti negli allevamenti: fecondazione artificiale, gestazione in gabbia, gestazione in box, sala parto, svezzamento, magronaggio, ingrasso.

Le operazioni a rischio considerate sono state: introduzione di animali con stato sanitario non conosciuto, carico di animali, di carcasse, entrata in azienda di veicoli, entrata-uscita personale e visitatori. Al fine della valutazione delle misure di biosicurezza sono stati considerati i requisiti strutturali dell'allevamento, le modalità gestionali, i mezzi di trasporto e il personale. In particolare sono stati presi come riferimento i requisiti riguardanti la biosicurezza esterna quali: presenza di parcheggio o area di sosta fuori dal perimetro aziendale per il personale e i visitatori, presenza di barriere e locali adibiti a spogliatoio. Per quanto riguarda i mezzi di trasporto sono stati considerati la piazzola per disinfezione dei veicoli, la presenza di disinfettanti e loro modalità di utilizzo, e la circolazione degli automezzi. In merito alla movimentazione degli animali sono stati considerati il carico/scarico di suini vivi, degli scarti e dei morti, e se questo avveniva all'interno o all'esterno del perimetro aziendale.

Prelievo dei campioni e Indagini di laboratorio

Sono stati consegnati in laboratorio suinetti deceduti in sala parto e svezzamento e campioni di fecisingle provenienti da soggetti con diarrea liquida o "in pool" prelevate nei box in cui erano presenti animali con sintomatologia. Sono stati esaminati 22 suinetti e 26 campioni di feci. I suinetti sono stati sottoposti a esame anatomopatologico e sono stati prelevati intestino ed altri organi quali fegato, milza e rene utilizzati per esame batteriologico al fine di procedere all'isolamento dei principali patogeni batterici enterici. La ricerca di Coronavirus (PEDV, TGEV e Deltacoronavirus) è stata eseguita su omogenati di intestino e feci mediante Real time RT-PCR specifiche (kit PED/TGE/PDCV, Tetracore, USA). Inoltre, la metodica ELISA sandwich (DAS-ELISA) basata sull'uso di anticorpi monoclonali sviluppati verso il ceppo di riferimento CV777 (7,8) è stata utilizzata per la ricerca di PEDV. In particolare, un numero variabile da 1 a 11 suinetti e da 6 a 10 campioni di feci è stato testato da tutte le aziende. L'analisi del genoma del ceppo presente in ogni azienda è stata eseguita tramite sequenziamento del gene S1 (2581 nt) e confrontata con ceppi presenti nella banca dati NCBI. La diagnosi differenziale è stata condotta per *E.coli*, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*, coccidi, Salmonella, TGEV, rotavirus.

RISULTATI

Allevamento 1

Sintomatologia. L'inappetenza e la diarrea liquida sono stati i sintomi comuni a tutti i settori dell'allevamento. La diarrea ha colpito ciascun settore con percentuali diverse: 51-100% in ingrasso e suinetti sottoscrofa; 21-50% gestazione in box, magronaggio e svezzamento; 6-20% in scrofe in sala parto, gestazione in gabbia e fecondazione artificiale. La comparsa della inappetenza e della diarrea liquida è avvenuta nella prima settimana di gennaio ed ha interessato inizialmente un capannone da ingrasso. Successivamente, la sintomatologia è passata alla gestazione in box e in gabbia, alle nidi in sala parto e, a distanza di 72 ore, tutti i settori sono stati interessati. In un unico capannone da ingrasso, dislocato a margine delle altre

strutture aziendali la comparsa dei sintomi è avvenuta dopo 5 giorni dall'inizio dell'epidemia. In sala parto è stata osservata agalassia e la mortalità dei suinetti per disidratazione e cachessia è stata del 25%. Il vomito è stato osservato nel 20% dei soggetti ed esclusivamente nel settore da ingrasso nella fase iniziale dell'epidemia.

Biosicurezza. L'azienda non ha una recinzione perimetrale e l'ingresso è posto su una strada comunale con elevato transito di mezzi. E' presente una piazzola per la disinfezione degli automezzi in entrata e viene utilizzato un disinfettante a base di glutaraldeide. Il carico dei suini in uscita dall'azienda e lo scarico del mangime avvengono all'interno del perimetro aziendale. Le carcasse vengono conservate in una cella frigorifera e la raccolta avviene all'esterno tramite un mezzo aziendale. In azienda viene effettuata la rimonta esterna senza una struttura destinata alla quarantena con l'acquisto di circa 50 animali ogni 4 mesi accompagnati da un certificato sanitario. L'ultimo acquisto di scrofette risale a ottobre 2014. La derattizzazione è eseguita da personale interno all'azienda. Sui terreni adiacenti al perimetro aziendale non è stato eseguito spargimento di liquame nell'ultimo mese.

Allevamento 2

Sintomatologia. In tutti i settori dell'allevamento è stata segnalata la comparsa di inappetenza e diarrea liquida nei primi giorni dell'episodio. Al momento della visita la diarrea era presente in suinetti sottoscrofa (21-50%) e in un capannone da ingrasso (0-5%). La comparsa dei sintomi risale all'ultima settimana di dicembre 2014. I riproduttori in lattazione hanno manifestato altresì agalassia mentre i suinetti sotto scrofa a conseguenza del deperimento e dello stato cachettico hanno registrato un tasso di mortalità del 30%. Il vomito non è stato segnalato in alcun soggetto. I primi soggetti che hanno manifestato la patologia sono stati gli animali all'ingrasso, successivamente l'infezione ha circolato nei settori dello svezzamento, gestazione e in ultimo in lattazione a distanza di 15 giorni dalla comparsa dei sintomi.

Biosicurezza. La proprietà non ha una recinzione, l'ingresso posto su una strada privata è provvisto di cancello chiuso. E' presente la piazzola di disinfezione degli automezzi, che prevede l'utilizzo di prodotti a base di glutaraldeide. Il carico dei suini da inviare al macello e lo scarico del mangime finito avviene all'interno dell'azienda. E' presente la cella frigorifera per la raccolta delle carcasse ma il carico non sempre avviene esternamente. L'introduzione di animali da rimonta avviene a cadenza mensile con l'introduzione dei nuovi soggetti in una struttura per la quarantena ricavata all'interno della pertinenza aziendale. L'ultima entrata di animali risale a novembre 2014. La derattizzazione è operata internamente.

Allevamento 3

Sintomatologia. L'inappetenza e la diarrea liquida sono state osservate in tutti i settori nei primi 10 giorni dopo la comparsa dell'epidemia. Al momento della visita la diarrea colpiva i settori con percentuali diverse ad eccezione delle scrofe presenti nella zona di fecondazione artificiale che non avevano sintomi. La percentuale di suinetti sottoscrofa colpiti era molto elevata (51-100%) mentre in gestazione in box, svezzamento, magronaggio ed ingrasso la percentuale era ridotta (6-20%). Nelle scrofe in gestazione in gabbia solo pochi soggetti presentavano diarrea (0-5%). In sala parto a fronte di pochi soggetti con diarrea (0-5%) era marcata l'inappetenza e l'agalassia nelle scrofe e la mortalità dei suinetti (50%). Il vomito non è stato segnalato. L'esordio della sintomatologia si è verificato nella prima settimana di gennaio 2015 ed ha coinvolto dapprima gli animali all'ingrasso. La sintomatologia dopo tre giorni ha coinvolto i riproduttori in gestazione, gli animali in svezzamento e in sala parto.

Biosicurezza. L'azienda ha una recinzione su tutto il perimetro aziendale, l'ingresso è posto su una strada privata e non vi è transito di mezzi destinati al trasporto di animali vivi. Esternamente sono presenti la cella frigorifera e la barriera sanitaria, con arco per la disinfezione automatica dei mezzi in entrata. Il disinfettante utilizzato è a base di glutaraldeide. La derattizzazione

è effettuata da una ditta esterna secondo un programma prestabilito. Sui terreni adiacenti al perimetro aziendale non vi è spargimento di liquami. La rimonta viene effettuata esternamente a cadenza semestrali di 30 soggetti per volta.

Esami di laboratorio

L'esame anatomico-patologico ha evidenziato in 16 soggetti grave disidratazione, cachessia ed enterite catarrale caratterizzata dall'assottigliamento della parete. Due soggetti presentavano pericardite fibrinosa e polmonite lobulare localizzata soprattutto ai lobi apicali. All'esame batteriologico sono stati isolati *E.coli* emolitico in 2 soggetti e *Clostridium perfringens* in 1 soggetto. Le indagini per ricerca di *C. difficile*, *Salmonella* e coccidi sono risultate negative. Nei due soggetti che presentavano pericardite fibrinosa è stato isolato *S. suis*. La conferma di presenza di PEDv è stata ottenuta sia con tecniche molecolari (RT-PCR) sia in DAS-ELISA, con una buona concordanza di risultati, come peraltro già evidenziato in precedenza (7). La diagnosi di PEDv è stata effettuata complessivamente su 22 campioni di intestino e 26 di feci. Nel primo allevamento, gli intestini di 11 suinetti sono risultati tutti positivi in PCR Real time, mentre tra le feci solo 3 campioni su 6 sono risultate positive. Nel secondo allevamento, l'intestino di un suinetto è risultato positivo mentre delle 10 feci analizzate, 6 sono risultate positive e 4 negative. Nel terzo allevamento tutti i suinetti testati (10) e tutte le feci (10) sono risultati positivi. Nella maggior parte dei suinetti testati i valori Ct, ottenuti in PCR real time, evidenziano una presenza virale molto elevata.

La sequenza del gene S1 (2581 nt) è stata eseguita a partire dai campioni provenienti da ogni allevamento. Il confronto con le sequenze depositate nella banca dati NCBI ha evidenziato il 99% di identità nucleotidica con il ceppo USA OH851 e altri ceppi circolanti sia negli Stati Uniti che in Europa (Germania), (9).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel mese di gennaio 2015 sono stati segnalati 3 episodi con sospetto clinico riferibile a PED, confermati successivamente in laboratorio mediante PCR e ELISA. In tutti i focolai si è osservato un quadro clinico sovrapponibile, caratterizzato da diarrea liquida, sia nei riproduttori che in suini in accrescimento e assenza di mortalità. Solo nei suinetti sottoscrofa la diarrea acuta e la disidratazione hanno comportato un aumento della mortalità compreso tra il 25 % e il 50 % per le tre settimane successive alla comparsa della sintomatologia. Inoltre le scrofe in sala parto sono state interessate da agalassia e, in un solo allevamento, il settore del magronaggio-ingrasso ha presentato vomito nei primi giorni di esordio della malattia.

Le modalità di comparsa della malattia, l'andamento e la gravità dei sintomi si sono dimostrati simili a quanto osservato nei casi verificatisi negli anni precedenti. Tuttavia, tale situazione (3 focolai nel volgere di 1 settimana diagnosticati in un'area ad elevata produzione suinicola), se confrontata con quanto successo negli ultimi anni potrebbe far preludere ad una recrudescenza epidemica della malattia, così come verificatosi nel 2005-2006 (6).

La diagnosi è stata fatta sia in RT-PCR che in DAS-ELISA. Se la RT-PCR è quindi da considerare il metodo di identificazione di elezione in caso di sospetto di PEDv per l'elevata sensibilità e specificità, la DAS-ELISA si conferma come metodo attendibile di screening in tutti quei casi di indagine in corso di enteriti del suino, anche in assenza di sintomi strettamente indicativi di un sospetto di PED.

L'analisi genomica basata sul sequenziamento del gene S1 dei ceppi identificati ha permesso di determinare che essi presentano un'elevata percentuale d'identità con il ceppo USA OH851 considerato a moderata patogenicità. Peraltro ceppi con le medesime caratteristiche erano stati rilevati nell'estate 2014 in Italia e in altri paesi Europei quali Germania (9), Olanda e Ucraina. Le verifiche eseguite sui fattori di rischio e le misure di biosicurezza esterna hanno evidenziato

nei tre allevamenti carenze soprattutto nella gestione della movimentazione degli animali vivi e nel controllo dell'accesso di personale, visitatori e operatori esterni. Il carico e scarico di animali all'interno del perimetro aziendale non sono stati sufficientemente garantiti da una adeguata e corretta procedura di circolazione, pulizia e disinfezione dei mezzi di trasporto. Inoltre, l'inadeguatezza della zona filtro ha dimostrato di non essere in grado di obbligare personale, visitatori e operatori ad indossare indumenti e calzature dedicate o monouso.

Le indagini epidemiologiche, ancora in corso, non hanno permesso di stabilire l'origine dell'infezione. Tuttavia, pur considerando l'attuale situazione di presenza epidemica della PED nel continente Americano e nell'Est Asiatico, va tenuto conto che la PED è da considerare endemica nel nostro Paese, dove è stata diagnosticata fin dagli anni '90 con picchi periodici di incidenza. Pertanto, se da un lato nessuna ipotesi va a priori scartata nella ricerca e definizione dei fattori di rischio che favoriscono la trasmissione dell'infezione, dall'altro è chiaro che solo la rigida applicazione di protocolli di biosicurezza può impedire e limitare il diffondersi dell'infezione.

BIBLIOGRAFIA

1. Hofmann and Wyler, 1989 M. Hofmann, R. Wyler. Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV). *Vet. Microbiol.*, 20 (1989), pp. 131–142
2. Saif et al., 2012.L.J. Saif, M.B. Pensaert, K. Sestak, S.-G. Yeo, K. Jung. CoronavirusesJ.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz, G.W. Stevenson (Eds.), *Diseases of Swine*, John Wiley & Sons, West Sussex, UK (2012), pp. 501–524
3. Stevenson et al., 2013. G.W. Stevenson, H. Hoang, K.J. Schwartz, E.R. Burrough, D. Sun, D. Madson, V.L. Cooper, A. Pillatzki, P. Gauger, B.J. Schmitt, L.G. Koster, M.L. Killian, K.J. Yoon. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 25 (2013), pp. 649–654
4. Goede, D.P., Morrison, R.B., 2014a. PED incidence, time to stability and production impact. In: Allen D. Leman Swine Conference. St. Paul, MN, USA, <https://docs.google.com/a/umn.edu/file/d/0BzGsnfsQ28heNEJlaHICamRLTkE/edit> (accessed 12.09.14).
5. Goede, D.P., Morrison, R.B., 2014b. Swine health monitoring project. Report 2014.16, http://www.cvm.umn.edu/sdec/prod/groups/cvm/@pub/@cvm/@sdec/documents/content/cvm_content_490361.pdf (accessed 12.09.14).
6. Martelli P., Lavazza A., Nigrelli A.D., Merialdi G., Alborali L.G., Pensaert M.B. (2008). An epidemic of diarrhoea caused by Porcine Epidemic Diarrhoea virus in Italy. *Vet. Rec* 2008 Mar 8 162(10):307-310
7. Sozzi E, Luppi A., Lelli D, Moreno Martin A, Canelli E, Brocchi E, Lavazza A, Cordioli P. (2010). Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for the detection of porcine epidemic diarrhoea virus. *Res. Vet. Sci.* 88(1):166-168.
8. Sozzi E, Luppi A, Lelli D, Moreno A, Canelli E, Cordioli P, Lavazza A, Brocchi E. (2008). Sviluppo e applicazione di un test ELISA per la determinazione del coronavirus della diarrea epidemica suina (PED). *Atti Convegno SIPAS*. - Vol. 34 – p. 247-252.
9. Hanke D, Jenckel M, Petrov A, Ritzmann M, Stadler J, Akimkin V, et al. Comparison of porcine epidemic diarrhea viruses from Germany and the United States, 2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2015 Mar [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2103.141165>

COMMERCIO INTERNAZIONALE, EVOLUZIONE E DISSEMINAZIONE VIRALE: ANALISI DELL'ETERogeneITÀ DI PCV2 IN ITALIA

INTERNATIONAL TRADES, LOCAL SPREAD AND VIRAL EVOLUTION: THE CASE OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 2 (PCV2) STRAINS HETEROGENEITY IN ITALY

*TUCCIARONE C.¹, *FRANZO G.¹, DOTTO G.¹, GIGLI A.², CEGLIE L.², DRIGO M.¹

*Equally contributing authors

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

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

Parole chiave: PCV2, Italia, epidemiologia, filogeografia.

Keywords: PCV2, Italy, epidemiology, phylogeography.

Riassunto

L'infezione da PCV2 è attualmente una di quelle più diffuse ed economicamente onerose del comparto suinicolo. Finora sono stati distinti quattro genotipi, di cui solo tre circolano effettivamente. Il commercio di bestiame e la rapida evoluzione virale hanno contribuito a determinarne l'elevata eterogeneità e la distribuzione di ceppi potenzialmente più virulenti.

Questo studio, volto a colmare la mancanza di informazioni sull'epidemiologia di PCV2 in Italia, ha preso in considerazione 75 sequenze del genoma completo, ottenute da campioni raccolti in Nord Italia tra il 2007 e il 2014. Le analisi filogenetiche, basate anche sul confronto con altre sequenze depositate in database pubblici, hanno dimostrato la co-circolazione di PCV2a, 2b e 2d entro i confini nazionali, con maggior prevalenza del genotipo 2b.

Le analisi filogenetiche, la localizzazione dei diversi aplotipi e le rotte commerciali internazionali, hanno quindi permesso di proporre svariati collegamenti e il ruolo dell'Italia come importatore ed esportatore di aplotipi di PCV2, primariamente da e verso Stati Europei e Asiatici. Una rete di connessioni ugualmente intricata è emersa anche entro i confini nazionali. Essenzialmente, questo articolo rappresenta la prima descrizione del panorama epidemiologico italiano legato a PCV2, dimostrando come l'elevata variabilità dei ceppi circolanti in Italia sia riconducibile a vari eventi di introduzione, all'ampia circolazione virale entro i confini nazionali e alla rapida evoluzione del virus.

Abstract

PCV2 infection is currently one of the most widespread and economically important for the pig industry. To date, four different genotypes have been recognized, but only three of these are actually circulating. Trading and rapid viral evolution have contributed to determine the high heterogeneity and distribution of potentially more virulent strains.

This study, aimed to fill the lack of information regarding the epidemiology of PCV2 in Italy, took into account 75 complete genome sequences obtained from samples collected in northern Italy between 2007 and 2014. The phylogenetic analysis, also based on the comparison with other sequences from public databases, have demonstrated the co-circulation of PCV2a, 2b and 2d within national boundaries, with higher prevalence of genotype 2b.

Phylogenetic analyses, the localization of the different haplotypes and international trade routes,

allowed to propose various connections and the role of Italy as an importer and exporter of haplotypes of PCV2, from and to other European and Asian countries. A complex network of connections emerged also within national borders. Essentially, this article represents the first description of the Italian epidemiology related to PCV2, showing how the high variability of the strains circulating in Italy is due to various events of introduction, extensive viral circulation within the national borders and the rapid evolution of the virus.

INTRODUZIONE

Il virus *Porcine circovirus type 2* (PCV2) è l'agente eziologico di una delle più importanti malattie infettive dei suini, ed è causa di ingenti perdite economiche attribuibili alla presenza di sindromi cliniche e subcliniche e all'attuazione di misure di controllo ad esse rivolte (Alarcon et al., 2013). PCV2 è un virus a singolo filamento di DNA privo di envelope, classificato nella famiglia *Circoviridae*, genere *Circovirus*, ed è l'unico in questo gruppo in grado di provocare malattia nei mammiferi. Il genoma virale è circolare e ambisenso, con dimensioni ridotte comprese tra i 1766-1768 nucleotidi e codifica 4 proteine principali (ORF1-4) (Lv et al., 2014).

Dal momento della sua emergenza all'inizio degli anni '90 PCV2 è stato messo in relazione a numerose sindromi, raggruppate nella definizione di Porcine Circovirus Diseases (Segales et al., 2012). Dopo le prime segnalazioni, l'infezione sostenuta da PCV2 è stata riportata in tutto il mondo e ha raggiunto proporzioni epidemiche in Europa e nel Sud-Est Asiatico alla fine degli anni '90 e in Nord e Sud America negli anni 2004-2005 (Segales et al., 2013).

Sulla base di precedenti studi filogenetici, è stata proposta una classificazione di PCV2 che ripartisce gli stipti virali in quattro genotipi principali: PCV2a, PCV2b, PCV2d e PCV2c (Franzo et al., 2014b). I primi tre hanno manifestato una distribuzione mondiale (Franzo et al., 2014b) mentre il PCV2c è stato ritrovato solo in campioni storici danesi (Dupont et al., 2008).

Il commercio internazionale di suini ha dimostrato di svolgere un ruolo predominante nella disseminazione dei vari ceppi di PCV2, coinvolgendo sia Paesi sviluppati che in via di sviluppo e influenzandone potenzialmente l'evoluzione (Firth et al., 2009; Drew, 2011; Vidigal et al., 2012; Segales et al., 2013). Il settore suinicolo in Italia, forte di circa 9 milioni di animali mediamente allevati ogni anno (FAOSTAT <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>), risulta di grande importanza economica; la vocazione alla produzione del suino pesante comporta maggiori problemi nella gestione e nel controllo delle patologie infettive, dovuti alla frequente compresenza di animali di età e fasi produttive diverse, con stato immunitario e sanitario differente. Inoltre, l'Italia è parte di un'estesa rete internazionale di scambi di animali vivi: nel solo 2013 sono stati infatti importati ed esportati rispettivamente 800000 e 15500 suini da e verso Paesi comunitari (<http://comtrade.un.org/data/> e <http://www.inea.it/banchedati>).

Questa situazione genera una combinazione di fattori favorevoli all'introduzione e la diffusione di virus, soprattutto quelli caratterizzati da eliminazione prolungata e che causano sintomatologia lieve o assente, come PCV2. Tuttavia non ci sono dati riguardanti la circolazione dei vari genotipi di PCV2 e della loro variabilità genetica nel panorama italiano. Il presente studio ha lo scopo di colmare queste lacune attraverso il sequenziamento dell'intero genoma di PCV2 da campioni raccolti in Italia a partire dal 2007. Ciò ha permesso di ottenere informazioni sulla distribuzione di PCV2 in Italia e sui potenziali legami epidemiologici con altri Paesi.

MATERIALI E METODI

Campioni ed estrazione del DNA

Novantasei campioni (polmoni, linfonodi e sieri), classificati positivi per PCV2 tramite immunoistochimica o real time-PCR, sono stati gentilmente forniti da laboratori diagnostici pubblici e privati. Tutti i campioni sono stati stoccati a -20°C fino all'estrazione del DNA. Prima

dell'estrazione, ciascun grammo di tessuto è stato omogenato meccanicamente in 5ml di PBS. Successivamente 200 μ L di omogenato o di siero sono stati utilizzati per l'estrazione del DNA, eseguita utilizzando il DNeasy® Blood and Tissue kit (Quiagen).

PCR e sequenziamento

Il genoma completo di PCV2 è stato amplificato mediante 4 distinte PCR validate nel corso del presente studio. Diverse coppie di primer, concentrazioni dei reagenti e protocolli termici sono stati valutati e successivamente validati al fine di ottenere la maggior resa in assenza di amplificati aspecifici. Gli amplificati ottenuti, previa purificazione, sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando i medesimi primer impiegati durante la PCR. La qualità dei cromatogrammi ottenuti è stata preliminarmente valutata tramite FinchTV (<http://www.geospiza.com>) e quindi le sequenze consenso sono state assemblate utilizzando ChromasPro (ChromasPro Version 1.5).

Analisi delle sequenze

Le sequenze dei genomi completi ottenuti nel presente studio sono state allineate con il metodo MUSCLE implementato in MEGA6. La presenza e le caratteristiche di eventuali fenomeni di ricombinazione sono state studiate tramite il programma RDP4. Le sequenze non ricombinanti del gene ORF2 dei ceppi italiani sono state genotipizzate confrontandole con il database di riferimento fornito da Franzo et al., (2014b); le relazioni filogenetiche fra le sequenze sono state ricostruite utilizzando sia un approccio di tipo Bayesiano che di Neighbour Joining, implementati rispettivamente nei software MrBayes e MEGA6. Quest'ultimo software è stato utilizzato, limitatamente agli stipti italiani, anche per calcolare la distanza fra le singole coppie di sequenze, nonché la distanza genetica media *intra*- e *inter*-genotipo. Le relazioni epidemiologiche fra l'Italia e altri Paesi sono state esaminate confrontando le sequenze ottenute nel presente studio con quelle depositate in GenBank. A tal fine è stato scaricato un numero rappresentativo di sequenze del gene ORF2 per le quali fossero disponibili informazioni sul Paese di origine del campione, ottenendo complessivamente 97 sequenze di PCV2a, 381 di PCV2b e 166 di PCV2d. Queste sono state allineate con le rispettive sequenze italiane e, a partire dai database così ottenuti, sono stati ricostruiti degli "*haplotype network*" specifici per ciascun genotipo utilizzando il metodo Median Joining implementato in Network4.6.1.2. Un analogo approccio analitico è stato usato per studiare lo scenario e le relazioni epidemiologiche, fra le province Italiane.

RISULTATI

Caratterizzazione genetica di PCV2 in Italia

Complessivamente, sono stati ottenuti 75 genomi completi di stipti di PCV2 campionati in 39 allevamenti dislocati in 11 province del Nord Italia nel periodo 2007-2014. Sulla base delle sequenze del gene ORF2, 3, 56 e 8 stipti sono stati classificati come appartenenti rispettivamente ai genotipi PCV2a, PCV2b e PCV2d. Il genotipo PCV2b è stato nettamente il più prevalente per l'intera durata dello studio, mentre il genotipo PCV2a è stato riscontrato solo sporadicamente fra il 2008 e il 2012. PCV2d, identificato per la prima volta nel 2010, è risultato presente nel nostro territorio sino al 2014.

Dieci stipti virali sono stati identificati come ricombinanti, riconducibili a 6 eventi di ricombinazione indipendenti. Tutti i genotipi sono risultati implicati negli eventi di ricombinazione, sebbene, con maggior frequenza, i genotipi PCV2b e PCV2d siano emersi come genotipi parentali (i.e. 4 eventi di ricombinazione su 6). Tutte le sequenze derivanti dal medesimo evento di ricombinazione sono state campionate in un ristretto arco spazio-temporale. Le sequenze italiane, sia considerando il genoma completo sia la sola ORF2, dimostrano una rilevante distanza genetica (i.e. range = 0-5,6% e 0-11% rispettivamente), specchio della circolazione di diversi genotipi nel nostro territorio. Tuttavia, anche all'interno dei singoli genotipi, la distanza genetica è rilevante e in particolare PCV2a è risultato essere caratterizzato dalla maggior distanza nucleotidica. Considerevole,

sebbene inferiore, risulta essere la variabilità genetica dei genotipi PCV2b e PCV2d. Risultati analoghi sono stati ottenuti valutando la distanza amminoacidica calcolata sulla proteina capsidica.

Distribuzione geografica di PCV2 e commerci internazionali

I network filogenetici basati sul Median Joining, rispetto ai più tradizionali alberi filogenetici, permettono di rappresentare simultaneamente i possibili alberi più parsimoniosi e di esprimere graficamente la frequenza dei diversi aplotipi in modo facilmente comprensibile. Queste caratteristiche, assieme alla possibilità di associare a ciascuna sequenza un dato carattere (e.g. luogo di origine), hanno permesso una rappresentazione intuitiva della struttura geografica di PCV2 e della sua diffusione.

Complessivamente, il quadro italiano è risultato essere assai complicato. PCV2a ha rivelato una stretta associazione fra la provincia di campionamento e l'aplotipo riscontrato. Anche PCV2d, identificato solamente in tre province, ha rivelato una tendenza dei ceppi filogeneticamente vicini ad interessare il medesimo areale. Completamente diversa è risultata invece la distribuzione di PCV2b, caratterizzata dalla presenza di diversi aplotipi nella medesima provincia e dal riscontro del medesimo aplotipo in province diverse (Fig.1). Anche in questo caso gli stipiti identici o fortemente correlati condividevano spesso la medesima provincia di origine. Dalla valutazione delle relazioni con ceppi campionati in altri Paesi è emerso che le sequenze di PCV2a italiane sono risultate far parte di due cluster comprendenti rispettivamente sequenze di origine europea e asiatica (Fig.2a). Una percentuale consistente degli stipiti italiani di PCV2b (34%) è risultata far parte di tre aplotipi presentanti un'ampia distribuzione a livello mondiale (Europa, Asia e Sud America). Degli aplotipi identificati solamente in Italia, quattro sono risultati filogeneticamente vicini ad altri aplotipi includenti sequenze italiane. Tuttavia, altri due aplotipi specificamente italiani non presentavano relazioni dirette con altre sequenze campionate in Italia (Fig.2b). Tutti gli stipiti italiani di PCV2d sono risultati identici o quantomeno altamente simili ad aplotipi comprendenti solamente o per la stragrande maggioranza stipiti asiatici (in particolare di origine cinese) (Fig.2c).

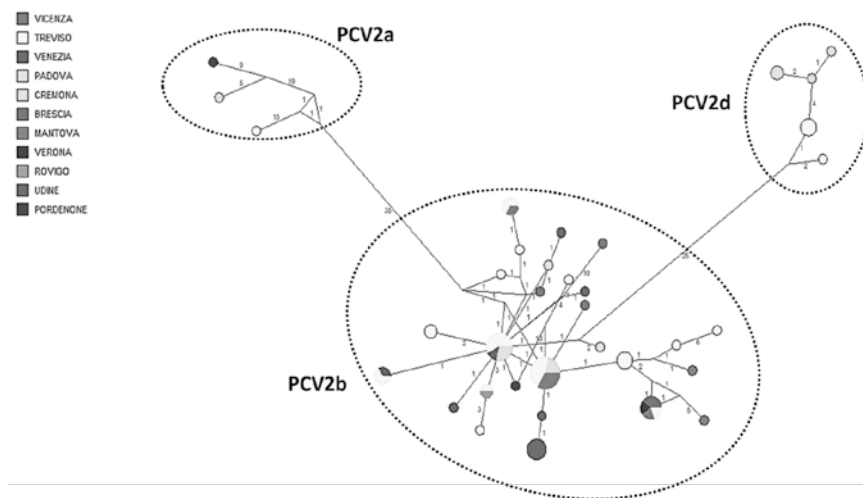


Figura 1. Haplotype network di PCV2. - Median-joining (MJ) network di tutti gli aplotipi di PCV2 italiani costruiti utilizzando il programma Network 4.6.1.20. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alla frequenza dell'aplotipo, mentre il numero di mutazioni

tra aplotipi è riportato vicino ai rami. Le province in cui sono stati raccolti i campioni sono rappresentate come un grafico a torta colorata con fette proporzionali alla frequenza della provincia.

Figure 1. Haplotype network of PCV2. Median-joining (MJ) network of all Italian PCV2 haplotypes built using the Network 4.6.1.20 program. The size of the circumferences is proportional to the haplotype frequencies, while the number of mutations between haplotypes is reported near the branches. Provinces where samples were collected are represented as a color-coded pie chart with slices proportioned to provinces' frequency.

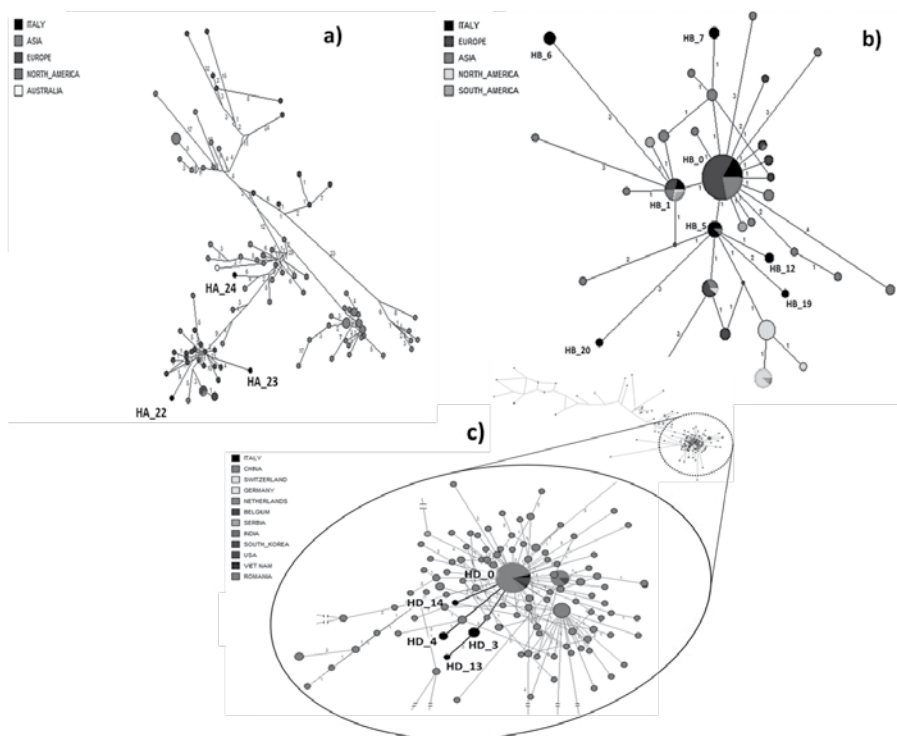


Figura 2. Median-joining (MJ) network di PCV2a (a), PCV2b (b) and PCV2d (c). Gli aplotipi sono raggruppati in base alla classificazione del genotipo. La dimensione delle circonferenze è proporzionale alle frequenze dell'aplotipo mentre il numero di mutazioni tra aplotipi è riportato vicino ai rami. Gli aplotipi sono colorati in base ai continenti dove sono stati raccolti i campioni mentre i campioni italiani sono colorati in nero.

Figure 2. Median-joining (MJ) network of PCV2a (a), PCV2b (b) and PCV2d (c). The haplotypes are grouped according to genotype classification. The size of the circumferences is proportional to the haplotype frequencies while the number of mutations between haplotypes is reported near the branches. Haplotypes are color coded according to the continents where samples were collected while Italian samples are colored in black.

DISCUSSIONE

L'obiettivo principale del presente studio è stato quello di fornire una prima panoramica

dell'epidemiologia molecolare dei ceppi di PCV2 circolanti in Italia, analizzando la presenza dei diversi genotipi e la loro eterogeneità.

Tutti i genotipi finora riconosciuti sono stati identificati anche in Italia, con la sola eccezione di PCV2c. La ripartizione dei genotipi è caratterizzata dalla netta predominanza di PCV2b, in accordo con quanto evidenziato in altri Paesi, dove numerosi autori hanno accertato uno shift genotipico da PCV2a a PCV2b a partire dal 2003 (Grau-Roma et al., 2011; Segales et al., 2013). Infatti, la presenza di alcuni ceppi PCV2a lontanamente correlati permette di ipotizzare un'analoga perdita di rilevanza di questo genotipo nel nostro Paese. Per contro, la ridotta finestra temporale esplorata dal nostro studio, congiuntamente all'assenza di dati pregressi sull'epidemiologia italiana di PCV2, non ha permesso di confermare l'avvenimento dello shift genotipico anche in Italia e di verificare l'andamento delle relazioni tra i genotipi. Stipiti di PCV2d, simili a quelli descritti in questo studio, sono stati campionati per la prima volta in Cina nel 2007 (Guo et al., 2010), circa 3 anni prima del riscontro italiano.

In questo studio è stata inoltre evidenziata la presenza di frequenti eventi di ricombinazione, caratteristica già ben accertata per i virus a singolo filamento di DNA (Lefevre et al., 2009) e per PCV2 in particolare (Hesse et al., 2008; Huang et al., 2013; Franzo et al., 2014b). Sicuramente, l'elevata frequenza di ricombinazione tra tutti i genotipi rilevati in Italia suggerisce una parimenti elevata frequenza di coinfezione, come già dimostrato in un recente studio incentrato su PRRSV (Franzo et al., 2014a). La vasta circolazione dei patogeni, confermata anche da dati filogeografici, ha verosimilmente svolto un ruolo determinante nel fenomeno della ricombinazione, rendendo manifesti anche i reali limiti della biosicurezza e delle strategie di controllo.

Sebbene il ruolo biologico della ricombinazione necessiti di ulteriori approfondimenti, la sua importanza non va sottovalutata poiché può significativamente condizionare la genotipizzazione dei ceppi falsando i risultati di studi epidemiologici.

Valutazioni ulteriori hanno sottolineato che la profonda variabilità *intra*-genotipica non può essere giustificata solo dall'evoluzione virale ma che sia più probabilmente attribuibile a molteplici eventi di introduzione. Quest'ipotesi è inoltre supportata dalla topologia dell'albero filogenetico, in cui sequenze italiane sono parte di *clades* diverse.

La ricostruzione dei network filogenetici ha permesso di vagliare le relazioni tra gli stipiti raccolti in Italia e in altri Paesi. È da tenere in considerazione la difficoltà nello stabilire la precisa connessione tra Paesi a causa dell'elevata incertezza filogenetica, che determina interconnessioni multiple soprattutto tra stipiti con alta percentuale d'identità. Un *bias* dipendente dal campionamento non può essere escluso, a causa dei differenti metodi e attività di sequenziamento attuati dai vari Paesi e della diversa qualità dei metadati disponibili tra le sequenze depositate. Ciononostante, le informazioni esistenti hanno ugualmente permesso di delineare una panoramica adeguata dell'epidemiologia di PCV2 in Italia, dei pattern di introduzione e di conseguente diffusione. Con elevata probabilità, tutti i genotipi sono stati oggetto di eventi introduttivi. Il genotipo 2a è stato importato con eventi separati, probabilmente da Asia ed Europa (Fig. 2a) e, di conseguenza, l'elevata variabilità italiana ne rispecchia l'eterogeneità nel mondo. Il riscontro di virus differenti e lontanamente correlati, in province italiane diverse, si può attribuire al calo della prevalenza e della circolazione di questo genotipo, risultante nel progressivo isolamento geografico degli stipiti. Al momento PCV2b è il genotipo prevalente e sono stati identificati numerosi aplotipi (Vidigal et al., 2012 e il presente studio), però solo 11 sono stati riscontrati in più di un Paese. Diciannove stipiti italiani di PCV2b (33,92%) appartengono a 3 di questi aplotipi, raccolti principalmente in Europa, Asia e Sud America. Nonostante l'elevata affinità tra gli aplotipi italiani di PCV2 possa suggerire una progressiva evoluzione dall'iniziale evento introduttivo, la presenza

dello stesso aplotipo in Paesi lontani contrasta questa stessa ipotesi (Fig.2b). La comparsa della medesima mutazione in regioni e momenti diversi è poco plausibile; un approccio più “parsimonioso” proporrrebbe un singolo evento mutazionale seguito dalla diffusione nei vari Paesi, Italia compresa, attraverso il commercio internazionale. Infatti, sequenze appartenenti allo stesso aplotipo sono state campionate principalmente in Paesi con cui l’Italia intrattiene rapporti commerciali, sia di import (Danimarca, Francia e Paesi Bassi) sia di export (Paesi dell’est Europa) di animali vivi (<http://comtrade.un.org/data/> accessed 25/08/2014). L’impatto delle esportazioni italiane sulla disseminazione virale è stato approfondito in un precedente studio con la dimostrazione dell’origine italiana di alcune sequenze slovene di PRRSV (Drigo et al., 2014). Allo stesso modo, il confronto tra sequenze italiane di PCV2 con una raccolta di sequenze parziali di ORF2 slovene conferma la stretta relazione tra virus campionati ai due lati del confine italo-sloveno. Nell’insieme, questi dati mettono in evidenza una situazione caratterizzata da un’ampia rete di connessioni commerciali ed epidemiologiche che ha facilitato l’introduzione da altri Paesi di vari stipiti, i quali si sono poi affermati, aumentando in prevalenza ed evolvendo rapidamente. Un’analoga eterogeneità è stata dimostrata entro i confini italiani dalla presenza di aplotipi diversi nella stessa provincia e dello stesso aplotipo in province diverse; ciò rispecchia la fitta circolazione di PCV2 in Italia, ulteriore elemento di sovrapposizione con PRRSV (Franz et al., 2014a), supportando come la co-circolazione di questi virus sia garantita dalle comuni vie di trasmissione e connessioni epidemiologiche. PCV2d è il genotipo di più recente introduzione in Italia ed è stato ritrovato principalmente in Asia (Ge et al., 2012), per quanto sia stato documentato anche in Europa e USA (Fig.2c). Come per PCV2b, la ristretta diversità genetica e l’elevato numero di reticolazioni ostacolano la ricerca di una precisa origine delle sequenze italiane. Ad ogni modo, gli stipiti italiani sembrano originare da aplotipi identificati preminentemente in Cina, come potenziali risultati di eventi introduttivi separati. La distribuzione geografica di PCV2d è, almeno in Italia, più semplice di quella di PCV2b, con la diffusione di ciascun aplotipo limitata a una sola provincia, anche se la stessa provincia ospita aplotipi differenti (Padova e Treviso). Curiosamente, non sono permessi scambi commerciali di suini vivi tra Italia e Cina e la Cina è essenzialmente un paese importatore dall’Europa (Vidigal et al., 2012 e <http://comtrade.un.org/data/> accessed 25/08/2014). La potenziale via di introduzione di PCV2 dalla Cina resta quindi ignota e non è possibile escludere altre fonti di disseminazione. Una sottostima della circolazione di PCV2 in Europa può essere peraltro imputabile alla scarsa attività di sequenziamento. In conclusione, questo articolo racchiude la prima descrizione del panorama italiano in relazione a PCV2 e dimostra come la variabilità dei ceppi italiani sia dovuta a molteplici eventi introduttivi e alla rapida evoluzione virale. L’importazione di aplotipi stranieri, provenienti dall’Europa ma potenzialmente anche dall’Asia, ne ha permesso l’introduzione in regioni e momenti diversi e la successiva disseminazione entro i confini nazionali, cui è seguita una rapida evoluzione come conseguenza dell’elevato tasso mutazionale (Firth et al., 2009) e dei fenomeni di ricombinazione. Questo studio rimarca i limiti delle attuali strategie di biosicurezza perpetrate in Italia e rivolte al contenimento dell’infezione da PCV2.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B., 2013. Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England - an economic disease model. *Prev. Vet. Med.* 110, 88-102.
- Drew, T.W., 2011. The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Rev. Sci. Tech.* 30, 95-106.

- Drigo, M., Franzo, G., Gigli, A., Martini, M., Mondin, A., Gracieux, P., Ceglie, L., 2014. The impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus genetic heterogeneity on molecular assay performances. *J. Virol. Methods* 202, 79-86.
- Dupont, K., Nielsen, E.O., Baekbo, P., Larsen, L.E., 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* 128, 56-64.
- Firth, C., Charleston, M.A., Duffy, S., Shapiro, B., Holmes, E.C., 2009. Insights into the evolutionary history of an emerging livestock pathogen: porcine circovirus 2. *J. Virol.* 83, 12813-12821.
- Franzo, G., Cecchinato, M., Martini, M., Ceglie, L., Gigli, A., Drigo, M., 2014a. Observation of high recombination occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in field condition. *Virus Res.* 194, 159-166.
- Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., Castro, A., Biaginni, P., Segalés, J., Drigo, M., 2014b. Revisiting the Taxonomical classification of PCV2: still a real challenge. *J. Virol.* (submitted).
- Ge, X., Wang, F., Guo, X., Yang, H., 2012. Porcine circovirus type 2 and its associated diseases in China. *Virus Res.* 164, 100-106.
- Grau-Roma, L., Fraile, L., Segales, J., 2011. Recent advances in the epidemiology, diagnosis and control of diseases caused by porcine circovirus type 2. *Vet. J.* 187, 23-32.
- Guo, L.J., Lu, Y.H., Wei, Y.W., Huang, L.P., Liu, C.M., 2010. Porcine circovirus type 2 (PCV2): genetic variation and newly emerging genotypes in China. *Virol. J.* 7, 273-422X-7-273.
- Hesse, R., Kerrigan, M., Rowland, R.R., 2008. Evidence for recombination between PCV2a and PCV2b in the field. *Virus Res.* 132, 201-207.
- Huang, Y., Shao, M., Xu, X., Zhang, X., Du, Q., Zhao, X., Zhang, W., Lyu, Y., Tong, D., 2013. Evidence for different patterns of natural inter-genotype recombination between two PCV2 parental strains in the field. *Virus Res.* 175, 78-86.
- Lefevre, P., Lett, J.M., Varsani, A., Martin, D.P., 2009. Widely conserved recombination patterns among single-stranded DNA viruses. *J. Virol.* 83, 2697-2707.
- Lv, Q.Z., Guo, K.K., Zhang, Y.M., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2. *Virus Genes* 49, 1-10.
- Segales, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Res.* 164, 10-19.
- Segales, J., Kekarainen, T., Cortey, M., 2013. The natural history of porcine circovirus type 2: from an inoffensive virus to a devastating swine disease? *Vet. Microbiol.* 165, 13-20.
- Vidigal, P.M., Mafra, C.L., Silva, F.M., Fietto, J.L., Silva Junior, A., Almeida, M.R., 2012. Tripping over emerging pathogens around the world: a phylogeographical approach for determining the epidemiology of Porcine circovirus-2 (PCV-2), considering global trading. *Virus Res.* 163, 320-327.

ELEVATA VARIABILITÀ GENETICA DI VIRUS INFLUENZALE SUINO IN UNA DELIMITATA AREA DELLA PIANURA PADANA

HIGH GENETIC VARIABILITY OF SWINE INFLUENZA VIRUS IN A CONFINED AREA OF NORTHERN ITALY

FONI E.¹, CHIAPPONI C.¹, BAIONI L.¹, MERENDA M.¹, MANDALARI C.¹, LUPPI A.¹
RUGNA G.¹, TAMBA M.¹, PELLACINI M.², FORLENZA J.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di riferimento OIE per influenza suina; ²Medico Veterinario

Parole chiave: virus influenza A, suino, variabilità genetica

Key words: influenza A virus, swine, genetic variability

Riassunto

Il virus dell'influenza A suina (SIAV) circola attivamente nella popolazione suina italiana e i sottotipi H1avN1, H1huN2hu, H3N2 and H1N1pdm sono riscontrati con maggior frequenza anche se occasionalmente vengono isolati stipiti riassortanti (*r*). Sono stati condotti accertamenti virologici e biomolecolari nei confronti di SIAV su 3 allevamenti, per complessive 5 unità produttive, in una delimitata area del Nord Italia. Complessivamente sono stati isolati 35 sottotipi di SIAV da cui sono stati selezionati 17 SIAV per la caratterizzazione genetica. Nell'allevamento a ciclo aperto A, 4 SIAV sono stati isolati, 2 SIAV sono stati caratterizzati come virus H1N2*r* appartenenti al lineaggio Papenburg circolante in Germania mentre 2 SIAV sono risultati virus H1N1pdm riassortanti con virus H1huN2hu circolanti nella popolazione suina italiana. Nell'allevamento di suini all'ingrasso B sono stati caratterizzati 4 SIAV riferibili al sottotipo H1avN1, mentre 2 isolati sono stati caratterizzati come H1huN2hu e, gli ultimi 2 come stipiti riassortanti H1avN2sw. Nell'allevamento a ciclo chiuso C (C1, C2 e C3 le tre unità produttive) è stata identificata la circolazione dei sottotipi H1avN1, H1huN2, H3N2, H1avN2*r* ed anche di uno stipite H1N2*r* riferibile al lineaggio Papenburg. Questo studio, se pur condotto su un numero limitato di aziende che circoscrivono un' area geografica ridotta, ha messo in evidenza una elevata variabilità nella composizione genetica dei SIAV coinvolti.

Abstract

Swine influenza A virus (SIAV) circulates actively in the Italian pig population and mainly subtypes H1avN1, H1huN2hu, H3N2 and H1N1pdm are detected, but also reassortant (*r*) strains are occasionally isolated. Considering a limited number of herds (n. 5) in a confined area of North Italy a high genetic variability of SIAVs was detectable. Farm A: a farrow to feeder farm, farm B: a finishing pig farm and farm C: a farrow to finish farm (C1, C2 and C3). Virological and biomolecular investigations for SIAV were performed and 17 isolates were selected for genetic studies. A: 4 H1N2 SIAVs were obtained. Genetic studies characterized 2 H1N2*r* pdm strains (German Papenburg lineage) and 2 H1N2*r* pdm strains showing H1N1pdm internal genes but HA and NA clustering with H1huN2hu Italian SIAV. B: 8 SIAVs were isolated. Four strains were characterized as H1avN1, 2 strains as H1huN2hu while 2 strains showed to be *r* strains H1avN2sw. C: 10 SIAVs belonging to different genetic lineages were detected: H1avN1, H1huN2hu,

H3N2, H1avN2r and also H1N2r strain clustering with the German lineage. The study underlines the increasing genetic diversity of Italian SIAVs even in a limited number of herds and even in those that did not introduce animals, in confined area of North Italy. Continuous surveillance of SIAV infections should be further reinforced to provide a baseline for updating and interpreting the role of SIAV in zoonotic events and to focus on relatedness to currently used vaccines.

INTRODUZIONE

L'influenza suina è annoverata tra le patologie che compongono il complesso delle patologie respiratorie del suino (PRDC) e considerata causa di perdite economiche per l'allevamento. L'infezione da virus dell'influenza A nel suino (SIAV), oltre ad avere importanti ripercussioni sanitarie, gioca anche un ruolo importante nella ecologia del virus influenzale in quanto questa specie è suscettibile alla infezione da parte di virus influenzali aviari ed umani ed è in grado di trasmetterli ad altre specie (Olsen et al., 2006; Kuntz-Simon and Madec, 2009; Zell et al., 2013).

Il genoma del virus influenzale A è costituito da 8 segmenti di RNA e viene convenzionalmente identificato a seconda delle caratteristiche delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) (Cheung and Poon, 2007). La peculiare costituzione del RNA del virus influenzale è alla base della sua marcata variabilità antigenica. L'emergenza di un nuovo virus influenzale A può realizzarsi grazie a diversi meccanismi: la trasmissione inter-specie, le mutazioni antigeniche (drift) e il riassortimento genetico dovuto allo scambio di geni tra due o più virus influenzali, anche originati da specie diverse. Nel corso del tempo tutti e tre questi meccanismi hanno condizionato l'evoluzione del SIAV in tutto il mondo, anche se nel virus influenzale suino il drift antigenico, contrariamente a quanto avviene per i virus umani, è quello meno frequentemente osservato (Brown, 2013). Pertanto anche se i sottotipi a circolazione enzootica nella popolazione suina di tutti i continenti sono H1N1, H1N2 e H3N2, la loro origine, le loro caratteristiche antigeniche e genetiche sono molto diverse nelle varie aree geografiche e per di più all'interno di queste subiscono ulteriori evoluzioni nel tempo. Ne consegue a riguardo uno scenario estremamente complesso e in continua evoluzione (Vincent et al., 2014).

Lo scenario italiano si caratterizza con la circolazione dei sottotipi: H1N1 di origine aviaria a diffusione europea (H1avN1), H3N2 originato da riassortimento di virus umani e suini (H3N2) anche questo rappresentativo dei virus H3N2 circolanti in Europa, ed infine, H1N2 riassortante di virus di origine umana e suina (Chiapponi et al., 2014a). Quest'ultimo presenta infatti i geni interni derivanti da H1avN1 ma HA di origine umana e NA derivante da virus influenzale H3N2 umano circolante alla fine anni 90 (H1huN2hu). Questo sottotipo H1huN2hu circolante nei nostri allevamenti è inoltre caratterizzato da una doppia delezione nella regione HA1 (Moreno et al., 2013; Chiapponi et al., 2014a) ed è andato man mano soppiantando il virus H1N2 di tipo europeo che invece mostrava una NA di un virus influenzale circolante nei suini in Regno Unito molti anni prima della stabilizzazione del sottotipo H3N2 negli anni '80 (Marozin et al., 2002; Zell et al., 2008). A partire dal 2009 si è osservata anche la circolazione del sottotipo H1N1 pdm (Moreno et al., 2010) che attualmente sembra essersi stabilizzato con una incidenza del 25% nell'ambito degli isolati sottotipo H1N1. Nell'ambito di questo scenario c'è da considerare la registrazione di numerosi eventi di riassortimento, 6,8% nell'ambito del sottotipo H1N1 ma 39,1% nell'ambito del sottotipo H1N2 (Chiapponi et al., In press 2015).

MATERIALE E METODI

Nell'ambito della attività diagnostica routinaria dei laboratori IZSLER sul territorio sono stati monitorati nel tempo in concomitanza con l'insorgenza di sintomatologia respiratoria tre unità produttive della filiera suina delle province di Modena e Reggio Emilia.

Allevamento A: allevamento ciclo aperto circa 900 scrofe, rimonta interna, commercializza suinetti di 30Kg. Non veniva praticata vaccinazione nei confronti di SIAV. Da Novembre 2013 per un anno sono stati registrati 15 conferimenti di tamponi nasali e/o polmoni per accertamenti diagnostici nei confronti di agenti di malattia respiratoria, complessivamente sono stati esaminati 34 campioni, la sintomatologia interessava esclusivamente suinetti di 20-25 Kg.

Allevamento B: Allevamento di produzione suino pesante Sito 2 (da 6Kg a 50Kg) e Sito 3 (da 50Kg fino alla macellazione), distanti 3,2 Km l'uno dall'altro. I suinetti vengono introdotti a gruppi di 400 soggetti a flusso continuo nelle strutture dell'allevamento da un unico fornitore. Non veniva eseguita vaccinazione nei confronti di SIAV. Da Luglio 2013 a tutto il 2014 sono stati conferiti 8 set di campioni per un totale di 46 tra tamponi nasali e tessuto polmonare. Nell'anno 2013 erano colpiti da forma respiratoria soggetti all'ingrasso e, nel 2014, i soggetti del Sito 2 di circa 40 kg.

Allevamento C: Allevamento costituito da una unità produttiva di 750 scrofe a ciclo chiuso (C1), una unità di produzione scrofette (C2) e una unità produttiva di finissaggio (C3) dei suini maschi provenienti da C2, nella quale vengono eseguite introduzioni anche di suini di provenienza diversa. Campioni diagnostici per diagnosi di affezione respiratoria sono stati conferiti con una certa alternanza negli anni. Nel 2009 sono stati eseguiti accertamenti nella unità C1 (soggetti di 20-30kg) e C2 (mortalità in scrofe). Nel 2010 si è iniziato a vaccinare le scrofe della unità produttiva C1. Nel 2011 si è osservata insorgenza sintomi respiratori prima in soggetti all'ingrasso e poi in lattoni nel ciclo chiuso C1. Nel 2012 sono state nuovamente colpite le scrofette in C2, mentre nel 2014 sono riscontrati casi di mortalità in soggetti all'ingrasso nella unità C3. Complessivamente sono stati esaminati 39 campioni diagnostici in 14 conferimenti successivi.

I campioni sono stati sottoposti ad accertamenti batteriologici e virologici appropriati seguendo le informazioni relative alla storia clinica e in base alle lesioni anatomopatologiche osservate. Tutti i campioni sono stati comunque processati ed esaminati per la ricerca del virus influenza suina. Complessivamente sono stati esaminati 119 campioni di tamponi nasali e/o polmoni con tecnica di Real-Time PCR per la ricerca di virus influenzale tipo A. I campioni positivi sono stati quindi sottoposti ad isolamento virale come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2010).

Una selezione di stipiti di SIAV isolati è stata sottoposta ad analisi genetica tramite sequenziamento genomico completo mediante sequenziatore MiSeq (illumina) (Chiapponi et al., 2014b). 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 metodo Maximum likelihood con il software IQTREE (Minh et al., 2013) e sono stati graficamente condensati mediante MEGA5 (Tamura et al., 2011). Sulla base della segregazione nell'albero filogenetico, ad ogni segmento genico virale è stato attribuito un genotipo: av-like, pdm, hu-like, sw-H3 per HA e av-like, hu-H3N2, sw-H3N2 per NA.

RISULTATI

Allevamento A: Dagli accertamenti virologici eseguiti sui 15 conferimenti pervenuti al laboratorio è stata riscontrata positività tramite Real Time PCR in 5 conferimenti (Marzo-Giugno 2014). L'analisi virologica condotta sui singoli campioni ha portato all'isolamento di 4 SIAV. Due di questi isolati (Marzo e Maggio) A/sw/It/79523/2014 e A/sw/It/124953/2014 sono stati caratterizzati come sottotipo H1pdm N2sw, ovvero virus H1N1pdm riassortante per la presenza di NA di origine suina e riferibili al lineaggio Papenburg cui appartengono SIAV frequentemente isolati negli allevamenti tedeschi (Lange et al., 2013). Di contro gli altri 2 isolati (Maggio e Giugno) A/sw/It/143711/2014 e A/sw/It/150383/2014 sono stati identificati geneticamente come H1N2 riassortanti pandemici in quanto presentavano i geni interni riferibili a virus H1N1pdm, ma HA di origine umana e NA di origine suina riconducibili agli antigeni caratterizzanti i virus sottotipo H1huN2hu circolanti nella popolazione suina italiana (Tab. 1, Fig. 1).

Allevamento B: I primi conferimenti da questa azienda provenivano dal Sito 3 nei mesi di Luglio, Agosto e Settembre 2013 ed erano rappresentati da gruppi di tamponi nasali. Dai tamponi conferiti nel mese di Luglio sono stati isolati 6 stipiti virali riferibili a sottotipo H1avN1 tramite tipizzazione biomolecolare con test PCR multiplex; uno stipite A/sw/It/191002/2013 è stato selezionato per lo studio genetico che ne ha confermato la correlazione con il gruppo di SIAV H1avN1. Dai 5 tamponi nasali conferiti in Agosto sono stati riscontrati 4 campioni positivi tramite Real Time PCR e, tramite tipizzazione biomolecolare, si sono caratterizzati 2 stipiti SIAV H1avN1 e 1 H1huN2. In uno dei tamponi è stata inoltre dimostrata la presenza contemporanea dei due sottotipi. Per genotipizzazione sono stati selezionati lo stipite A/sw/It/198930-1/2013 e lo stipite A/sw/It/198930-3/2013 (Tab. 1). L'analisi genetica ha reso possibile inquadrarli rispettivamente come H1avN1 e H1huN2hu e pertanto assimilabili ai sottotipi più frequentemente riscontrati nei nostri allevamenti. Anche il virus isolato dai campioni di Settembre 2013, A/sw/It/244504-1/2013, è stato caratterizzato come H1avN1. A distanza di un anno dai campioni conferiti dal Sito 2 sono stati isolati 10 SIAV da tamponi nasali (Ottobre 2014) e 1 SIAV da polmone (Dicembre 2014). Sono stati selezionati rispettivamente lo stipite A/sw/It/281230/2014 e A/sw/It/333140/2014 che sottoposti ad analisi filogenetica sono risultati stipiti H1N2 riassortanti per HA (di origine aviaria) e per NA (di origine suina), questi virus hanno quindi una NA diversa da NA degli stipi italiani che ha origine umana (Tab.1, Fig. 1).

Allevamento C: Nel 2009 sono stati interessati da sintomatologia respiratoria a distanza di qualche mese la struttura a ciclo chiuso (C1), interessati i soggetti di 20-30 kg, e la struttura per la produzione di scrofette C2, rispettivamente sono stati isolati 2 stipiti di SIAV sottotipo H1avN1 (A/sw/It/7189/2009) e un SIAV H1huN2hu (A/sw/It/199144/2009). Nel 2011 i sintomi si presentano di nuovo nella struttura C1, ma in questo caso sono coinvolti prima i soggetti all'ingrasso e poi i lattoni. Da questo episodio sono stati isolati 3 SIAV tutti tipizzati come H3N2, lo stipite identificativo di questo episodio è A/sw/It/171855/2011. Nel 2012 da tamponi nasali prelevati da scrofette in magronaggio nella struttura C2 si è riscontrato l'isolamento di 4 SIAV che l'analisi filogenetica ha inquadrato come stipiti H1N2 riassortanti per antigene HA di origine aviaria H1N1, lo stipite identificativo di questo focolaio è A/sw/It/224721-3/2012. Da polmoni di suini all'ingrasso della struttura C3 nel settembre 2014 è stato isolato uno stipite virale, A/sw/It/246087/2014 riferibile a virus appartenenti al lineaggio tedesco "Papenburg" (Tab. 1, Fig. 1).

Tabella 1. Virus sottoposti ad analisi genetica, origine, mese del prelievo e caratterizzazione genetica del genoma virale.

virus	Allevamento	Mese prelievo	PB1, PB2, PA, NP, M, NS	HA	NA	sottotipo
A/swine/Italy/79523/2014	A	Mar 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw
A/swine/Italy/124953/2014	A	Mag 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw
A/swine/Italy/143711/2014	A	Mag 2014	PDM	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu r pdm
A/swine/Italy/150383/2014	A	Giu 2014	PDM	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu r pdm
A/swine/Italy/191002/2013	B	Lug 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/198930-1/2013	B	Ago 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/198930-3/2013	B	Ago 2013	AV-LIKE	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu
A/swine/Italy/244504/2013	B	Sett 2013	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/281230/2014	B	Ott 2014	AV-LIKE	AV-LIKE	SW-H3N2	H1avN2sw
A/swine/Italy/333140/2014	B	Dic 2014	AV-LIKE	AV-LIKE	SW-H3N2	H1avN2sw
A/swine/Italy/7189/2009	C1	Gen 2009	AV-LIKE	AV-LIKE	AV-LIKE	H1avN1
A/swine/Italy/199144/2009	C2	Ago 2009	AV-LIKE	HU-LIKE	HU-H3N2	H1huN2hu
A/swine/Italy/171855/2011	C1	Lug 2011	AV-LIKE	SW-H3	SW-H3N2	H3N2
A/swine/Italy/224721/2012	C2	Sett 2012	AV-LIKE	AV-LIKE	HU-H3N2	H1avN2hu
A/swine/Italy/246087/2014	C3	Sett 2014	PDM	PDM	SW-H3N2	H1pdmN2sw

DISCUSSIONE

Le unità produttive considerate in questo studio sono situate in un'area piuttosto limitata, se si considera l'ampiezza del territorio su cui i laboratori IZSLER svolgono il monitoraggio sanitario dell'allevamento suino. Infatti considerando la disposizione geografica di questi allevamenti sul territorio si osserva come essi delimitano un poligono di 388 Km² sul quale insistono complessivamente 63 allevamenti da ingrasso e 20 allevamenti da riproduzione, per un numero complessivo di circa 90.000 capi, pari ad una densità di circa 220 suini per Km². Gli allevamenti considerati al massimo distano fra di loro poco più di 26 km (Fig. 2). Questo studio è stato condotto considerando l'insieme

delle ricerche eseguite per influenza nel corso della attività diagnostica di routine per la diagnosi eziologica di forme respiratorie in suini di varie età e in diverse tipologie. Pur operando in questo ristretto ambito territoriale, con un numero limitato di aziende, operando sull'input della casualità di insorgenza della sintomatologia e con un numero limitato di conferimenti (n. 37) è stato possibile registrare non solo un consistente numero di isolamenti di SIAV (n. 35), ma soprattutto una elevata variabilità della composizione genica degli stipiti virali. Nell'allevamento A è stata evidenziata infatti la circolazione di due virus riassortanti pandemici di cui uno caratterizzato dal riassortimento con antigeni esterni HA e NA riportabili ai virus influenzali italiani sottotipo H1huN2hu e l'altro ad uno stipite sovrapponibile a quello diffuso negli allevamenti tedeschi (lineaggio "Papenburg") lo stesso virus è stato anche isolato nell'ingrasso C3 (Fig. 1) che comunque dista 26 Km da A. (Fig. 2). Va puntualizzato che da analisi genetiche eseguite su una selezione di 117 virus effettuata su complessivi 324 SIAV ottenuti da 5228 campioni esaminati (Chiapponi et al., In press 2015) gli unici SIAV riferibili a Papenburg sono i 3 descritti in questo studio. Nell'allevamento B invece nel corso di un solo anno è stata osservata la circolazione del sottotipo H1avN1 e di due riassortanti del sottotipo H1N2 (Fig.1).

Nel caso dell'allevamento B la continua introduzione di animali può aver senz'altro rivestito ruolo primario nel facilitare il rimescolamento genico, mentre questo aspetto non è riscontrabile, come evento determinante, nell'allevamento A, C1 e C2, essendo questi allevamenti che non introducono suini, in ciascuno di questi sono infatti circolati, rispettivamente, 2 e 3 lineaggi diversi. Del resto la trasmissibilità di SIAV attraverso le correnti di aria, almeno fino a 2,1 km è stata recentemente dimostrata (Corzo et al., 2013).

CONCLUSIONI

Lo studio conferma che negli allevamenti suini emiliani vi è una continua introduzione e circolazione, anche contemporanea di più stipiti di SIAV. Questo riscontro è stato evidenziato anche in due allevamenti che non introducevano animali vivi, a conferma dell'ipotesi di diffusibilità del SIAV per via aerea anche a distanza ragguardevole. Il riscontro in quest'area di SIAV appartenenti a lineage tedesco "Papenburg" potrebbe essere ricondotto alla vicinanza degli allevamenti considerati allo snodo autostradale modenese che rappresenta un punto cruciale degli scambi commerciali tra Europa centro-settentrionale e l'Italia sia di suini vivi che delle loro carni. La marcata variabilità dei SIAV circolanti negli allevamenti sottolinea anche la necessità di porre massima attenzione nella interpretazione dei dati sierologici di screening sulla circolazione di SIAV nei nostri allevamenti; la cross reattività generata da circolazione di riassortanti infatti potrebbe determinare quadri non ben definiti. In questo scenario non va inoltre dimenticata l'opportunità di monitorare nel tempo l'adeguatezza dei vaccini correntemente utilizzati nei nostri allevamenti. La possibilità di affiancare alla attività di sorveglianza passiva programmi di sorveglianza attiva ben definiti nel tempo e nello spazio potrebbe garantire migliori risultati nella mappatura dei vari lineaggi di SIAV circolanti. Questa attività darebbe maggiore garanzia anche riguardo alla possibilità di evidenziare precocemente la circolazione di stipiti influenzali che potrebbero avere acquisito potenziali capacità patogene per le altre specie, in particolare per l'uomo.

Fig.1. Alberi filogenetici condensati dei segmenti HA-H1, NA-N1 e NA-N2 ottenuti dall'allineamento delle sequenze dei virus dello studio con sequenze virali presenti in Genbank o di isolati IZSLER.

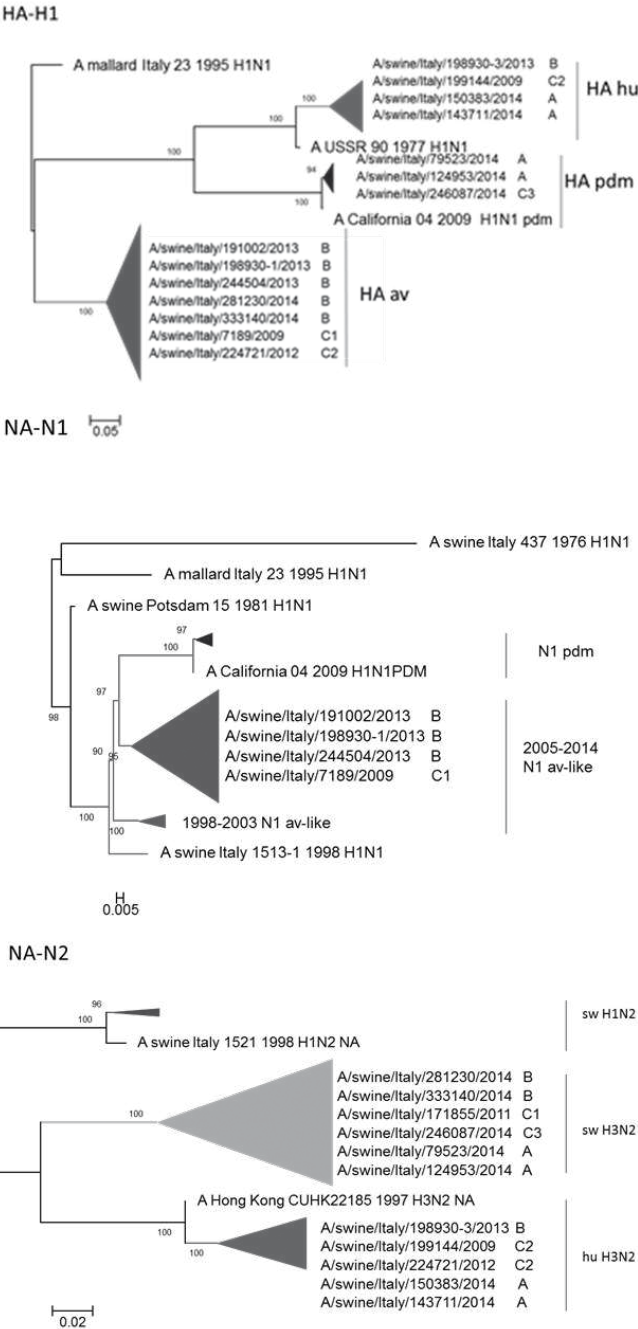
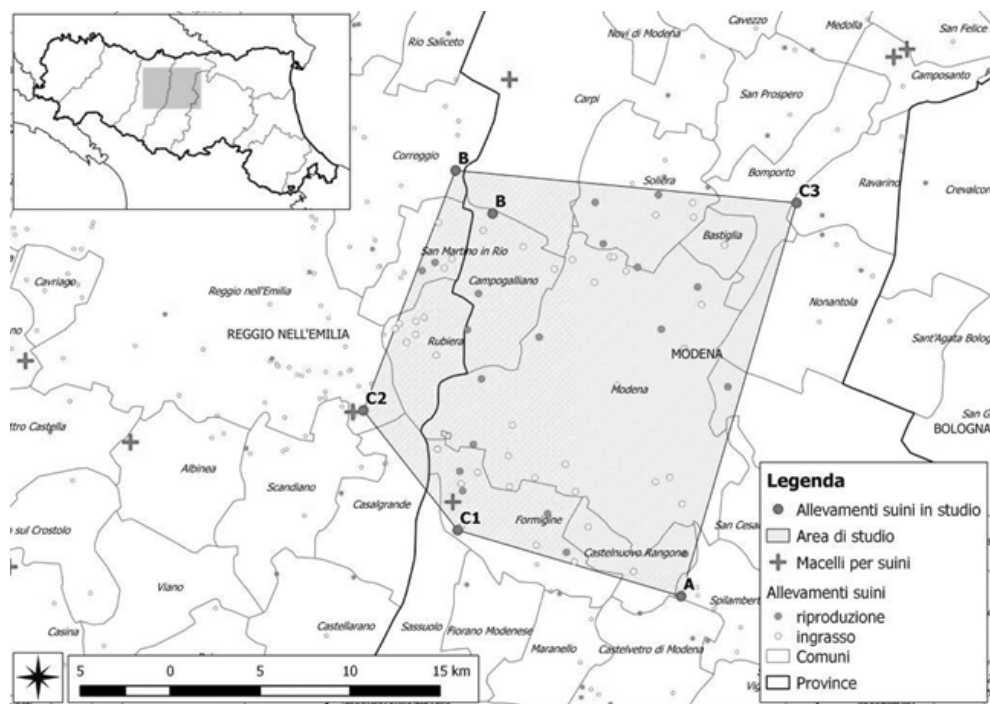


Fig. 2. Mappa della regione interessata dallo studio



RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Sig.ra Roberta Manfredi per l'eccellente supporto tecnico. Lo studio è stato parzialmente finanziato dal Progetto di Ricerca Corrente PRC2012002.

BIBLIOGRAFIA

- Brown, I.H., (2013). History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370: 133-146.
- Cheung, T.K., Poon, L.L., (2007). Biology of influenza A virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102: 1-25.
- Chiapponi, C., Baioni, L., Moreno, A., Alborali, G. L., Lelli, D., Luppi, A., Faccini, S., Vaccari, G., Boni, A., Zaccaria, G. and Foni, E. (In press 2015). Genetic variability of swine influenza viruses in Italy: 2009-2014. 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases ISERP 2015, June 2015.
- Chiapponi, C., Moreno, A., Baioni, L., Luppi, A., Faccini, S. and Foni, E. (2014a). Genetic characterization of Italian swine influenza viruses : 2011-2013. *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress*, June 8 - 11, Cancun, Mexico, 315.
- Chiapponi, C., Baioni, L., Luppi, A., Moreno, A., Castellan, A., Foni, E., (2014b). Temporal insight into the natural generation of a new reassortant porcine influenza virus in a swine holding. *Vet. Microbiol.* 174: 9-15.
- Chiapponi, C., Zanni, I., Garbarino, C., Barigazzi, G., Foni, E., (2010). Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza

A viruses. *J. Virol. Methods* 163: 162-165.

Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., (2013). Airborne detection and quantification of swine influenza A virus in air samples collected inside, outside and downwind from swine barns. *PLoS One* 8: e71444.

Kuntz-Simon, G., Madec, F., (2009). Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public. Health.* 56: 310-325.

Lange, J., Groth, M., Schlegel, M., Krumbholz, A., Wiczorek, K., Ulrich, R., Koppen, S., Schulz, K., Appl, D., Selbitz, H.J., Sauerbrei, A., Platzer, M., Zell, R., Durrwald, R., (2013). Reassortants of the pandemic (H1N1) 2009 virus and establishment of a novel porcine H1N2 influenza virus, lineage in Germany. *Vet. Microbiol.* 167: 345-356.

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., Higgins, D.G., (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.

Marozin, S., Gregory, V., Cameron, K., Bennett, M., Valette, M., Aymard, M., Foni, E., Barigazzi, G., Lin, Y., Hay, A., (2002). Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. *J. Gen. Virol.* 83: 735-745.

Minh, B.Q., Nguyen, M.A., von Haeseler, A., (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol. Biol. Evol.* 30: 1188-1195.

Moreno, A., Di Trani, L., Alborali, L., Vaccari, G., Barbieri, I., Falcone, E., Sozzi, E., Puzelli, S., Ferri, G., Cordioli, P., (2010). First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol. J.* 4: 52-56.

Moreno, A., Gabanelli, E., Sozzi, E., Lelli, D., Chiapponi, C., Ciccozzi, M., Zehender, G., Cordioli, P., (2013). Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses. *Vet. Res.* 44: 112.

Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., (2006). Swine influenza. 9th edn, Blackwell Publishing Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds),.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.

Vincent, A., Awada, L., Brown, I., Chen, H., Claes, F., Dauphin, G., Donis, R., Culhane, M., Hamilton, K., Lewis, N., Mumford, E., Nguyen, T., Parchariyanon, S., Pasick, J., Pavade, G., Pereda, A., Peiris, M., Saito, T., Swenson, S., Van Reeth, K., Webby, R., Wong, F., Ciacci-Zanella, J., (2014). Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. *Zoonoses Public. Health.* 61: 4-17.

Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P., Durrwald, R., (2008). Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Arch. Virol.* 153: 2085-2092.

Zell, R., Scholtissek, C., Ludwig, S., (2013). Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 370: 29-55.

POSTERS

**L'EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI
ALLILTREMBOLONE SULLA FERTILITÀ E PROLIFICITÀ
DELLA SCROFETTA NON VARIA CON LA STAGIONE
DELL'ANNO IN CUI È ESEGUITO IL TRATTAMENTO**

***THE EFFECT OF ALLYL TREMBOLONE ADMINISTRATION ON
FERTILITY AND PROLIFICITY IN GILTS DOES NOT VARY WITH
THE SEASON OF THE TREATMENT***

AMORICO A.¹, DE RENSIS F.², SCOLLO A.¹, BONILAUDI P.³, MAZZONI C.¹

¹ SUIVET snc, Reggio Emilia, Italia;

² Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, Italia; ³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: stagione, scrofette, alliltrembolone, fertilità, prolificità

Key word: season, gilts, alliltrembolone, fertility, prolificacy.

Riassunto

L'obiettivo del presente studio è stato quello di indagare l'effetto della somministrazione di Alliltrembolone sulla fertilità e sul numero di suinetti nati durante le differenti stagioni dell'anno.

Il tasso di gravidanza non è stato influenzato dalla stagionalità sia nel gruppo trattato con Alliltrembolone sia negli animali di controllo non trattati.

Il numero di suinetti nati totali non è stato differente tra gli animali di controllo e quelli trattati con alliltrembolone, è stata comunque rilevata una maggiore omogeneità nel numero di nati nel gruppo degli animali trattati rispetto ai controlli.

Nel gruppo degli animali di controllo il numero di suinetti nati è risultato maggiore nel periodo Settembre-Novembre rispetto agli altri periodi dell'anno.

Questi risultati indicano che il tasso di gravidanza ed il numero di suinetti nati totali negli animali trattati con Alliltrembolone non viene modificato dal periodo dell'anno in cui è effettuato il trattamento.

Abstract

The aim of this study has been to investigate the effect of administration of the progestin Allyltrembolone on pregnancy rate and piglets born during different seasons of the year. The progestin Allyl-trembolone has been administered for 18 days, one group has been not treated.

In the allyltrembolone treated animals pregnancy rate and total number of piglets born was not modified by the season of the treatment. Furthermore there were no differences between treated and control animals.

The conclusion of this study is that the efficacy of allyltrembolone treatment in terms of pregnancy rate and total number of piglets born is similar during the different season of the year.

INTRODUZIONE

Negli allevamenti suini dove è praticato il sistema a bande plurisettimanali è necessario avere costantemente dei lotti di scrofette disponibili per la rimonta. Dato che questi animali vanno in estro in modo casuale, e pertanto risulta sconosciuta la fase del ciclo in cui si trovano, si può aumentare l'efficienza riproduttiva dell'azienda adottando la sincronizzazione degli estri. Tra i vari trattamenti quello maggiormente efficace si basa sulla somministrazione di un analogo del progesterone, l'Alliltrembolone (Day et al., 1984; Gordon et al., 1997; Webel et al., 1982; Kraeling et al., 1981; Stevenson & Davis 1982; Martinat-Botte et al., 1989;1990; Wood et al., 1992). La somministrazione dell'Alliltrembolone blocca la secrezione di gonadotropine (FSH e LH) da parte dell'ipofisi (Redmer and Day, 1981). Di conseguenza sono inibite la crescita e lo sviluppo follicolare e quindi la comparsa dell'estro e dell'ovulazione. Una volta terminata la somministrazione del progestinico avviene un incremento della secrezione di gonadotropine e inizia la crescita e lo sviluppo follicolare e quindi, nell'arco di 4-7 giorni, dell'estro e dell'ovulazione (Kraeling et al., 1981; Kirkwood, 1999; Redmer and Day, 1981; Stevenson et al., 1982; Koutsotheodoros et al., 1998; Wood et al., 1992). Il trattamento può essere effettuato per 14 o 18 giorni consecutivamente con un effetto leggermente migliore in seguito a una somministrazione protratta per 18 rispetto a 14 giorni (Martinat-Botte et al. 1990).

Il trattamento delle scrofette con Alliltrembolone incrementa il tasso di ovulazione (Martinat-Bottè 1995; Koutsotheodoros et al., 1998), la fertilità al 22°-42° giorno di gestazione, la percentuale di animali che partoriscono e la consistenza della nidiata (Martinat-Bottè et al., 1990, 1995). Purtroppo il trattamento con Alliltrembolone non sempre dà i risultati attesi. Il motivo di tale variabilità non è ancora noto. In letteratura vi sono dati che indicano come in estate e all'inizio dell'autunno, ci sia una riduzione della fertilità nella scrofa. Un'altra ipotesi potrebbe essere correlata alla durata del trattamento con il progesterone. Infatti, nella specie ovina (Vignoles et al., 2001) e bovina (Noble et al., 2000; Garcia Ispuerto et al., 2013; Roche et al., 1974a,b; Brink et al., 1988) un trattamento con progesterone per un periodo prolungato (> 9gg) riduce la fertilità in quanto prolunga la fase di dominanza follicolare e porta all'ovulazione di oociti "invecchiati" che sono poco fertili e/o portano alla formazione di embrioni di scarsa qualità aumentando così il rischio di perdite embrionali.

Nella specie suina, la fertilità non è costante durante tutto l'arco dell'anno ma presenta generalmente dei cali significativi durante il periodo estivo e, in parte, anche in quello autunnale (Auvigne et al., 2010; Edwards et al., 1968; Omtvedt et al., 1971; Xue et al., 1994; Love et al., 1995; Prunier et al., 1997; Peltoniemi et al., 2006).

L'obiettivo del presente studio è stato quello di indagare l'effetto della somministrazione del progestinico, l'Alliltrembolone, somministrato per un periodo di 18 giorni sul tasso di gravidanza e sul numero di suinetti nati durante le differenti stagioni dell'anno.

MATERIALI E METODI

Animali

L'esperimento è stato condotto in un allevamento di circa 600 scrofe presenti in sito nella pianura padana localizzato nel nord Italia tra Febbraio 2011 e Gennaio 2013. Il management aziendale era a bande trisettimanali con 7 bande da 80 parti cadauna. La durata della lattazione è stata di 28 giorni.

Le scrofette, di genetica ibrida commerciale inglese, sono state introdotte in allevamento a $233 \pm 3,6$ giorni di età e ad un peso medio di $136 \pm 7,6$ Kg a gruppi di circa 20 soggetti ogni 3 settimane. Sono state alimentate con un mangime commerciale specifico ed avevano acqua disponibile *ad libitum*.

Nell'allevamento la temperatura non ha superato i 29°C durante il periodo estivo grazie alla presenza di un sistema di raffreddamento.

L'anno è stato diviso in quattro periodi in base alla stagione, da Dicembre a Febbraio, da Marzo a Maggio, da Giugno ad Agosto e da Settembre a Novembre. Gli animali sono stati esposti al fotoperiodo naturale.

La diagnosi di gravidanza è stata effettuata per via ecografica a 28-32 giorni dall'ultima inseminazione.

Protocollo Sperimentale

458 scrofette puberi, con estri previamente accertati, sono state distribuite in due gruppi sperimentali in modo casuale:

- Gruppo AL-18gg (n°= 194): il progestinico Alliltrembolone è stato somministrato per 18 giorni e le scrofette sono state inseminate alla comparsa del primo estro successivo alla fine del trattamento.

- Group CONT (n°=264): le scrofette non sono state trattate con Alliltrembolone e sono state inseminate alla comparsa dell'estro naturale.

L'Alliltrembolone (20mg/scrofetta/die) è stato somministrato in una piccola quantità di alimento, all'interno di gabbie gestazione a ciascuna scrofetta, prima del pasto del mattino, al fine di garantirne la corretta assunzione.

Sono stati registrati: il tasso di gravidanza (numero di animali inseminati che hanno partorito) e il numero totale di suinetti nati.

Analisi Statistica

Le differenze sul tasso di gravidanza tra i gruppi e le stagioni sono stati esaminati utilizzando il test di Fisher (Fisher exact test). Per confrontare le differenze nel numero totale di suinetti nati è stato utilizzato il test di Wilcoxon-Mann-Whitney Test.

RISULTATI

La durata media della gestazione è stata simile tra i vari gruppi: 116.2±2.4 per il gruppo CONT e di 115.7±2.2 giorni per il gruppo AL-18gg.

Non si sono osservate differenze tra i gruppi nel tasso di gravidanza tra il gruppo trattato con alliltrembolone e i controlli (Tabella 1).

Tab.1 Tasso di gravidanza nei periodi da Dicembre a Febbraio, da Marzo a Maggio, da Giugno ad Agosto e da Settembre a Novembre nel gruppo Controllo (gruppo CONT) e nel gruppo trattato con alliltrembolone per 18 gg (AL-18gg).

Tab.1 Pregnancy rate periods from December to February, from March to May, from June to August and from September to November in the control group (group CONT) and in the alliltrembolone for 18 days treated group (AL-18GG).

Periodo	CONT	AL-18gg
Dic-Feb	87.3% (71)	86,3% (20)
Mar-Mag	89.7% (29)	90.6% (42)
Giu-Ago	90.9% (77)	81.1% (84)
Sett-Nov	83.9% (87)	81.8% (48)
Totale	87.5% (264)	84.9% (194)

Nel gruppo di animali trattati con Alliltrembolone il numero di suinetti nati totali non è stato influenzato dalla stagione (Tab. 2). Nel gruppo di Controllo è stato osservato un maggiore numero di suinetti nati nel periodo di Settembre–Novembre rispetto agli altri periodi dell'anno (Tab.2).

TAB. 2. Mean $\pm$ ds del numero di nati totali nei periodi da Dicembre a Febbraio, da Marzo a Maggio, da Giugno ad Agosto e da Settembre a Novembre nei gruppi CONT e AL-18gg. ^{x,y} i dati con apice diverso sono differenti nella stessa colonna. (p<0.05).

TAB. 2 Number of total piglets born from December to February, from March to May, from June to August and from September to November in the control group (group CONT) and in the alliltrembolone for 18 days treated group (AL-18GG). ^{x,y} data with different superscript are different whitin the column (p<0.05).

Mesi	controlli	AL-18gg
1 dic-feb	12.37 $\pm$ 3.84 ^x	13.43 $\pm$ 3.31 ^x
2 mar-mag	11.85 $\pm$ 3.64 ^x	13.75 $\pm$ 3.01 ^x
3 giu -ago	11.84 $\pm$ 3.99 ^x	13.55 $\pm$ 3.56 ^x
4 set -nov	13.54 $\pm$ 3.56 ^y	13.33 $\pm$ 4.09 ^x

DISCUSSIONE

È stato dimostrato che, in seguito alla somministrazione di Alliltrembolone, nella scrofetta oltre l'80% degli animali trattati va in estro nell'arco di 5-6 gg, con tassi di gravidanza tra il 70% e l'80% (Kraeling et al., 1981; Martinat-Bottè et al., 1989,1990, 1995; Stevenson et al., 1982; Wood et al., 1992). I dati del nostro studio sono conformi a tali osservazioni. Nel nostro lavoro è stato anche investigato se il tasso di gravidanza delle scrofette trattate con progesterone potesse essere influenzato dal periodo dell'anno in cui il trattamento è effettuato. I risultati indicano che nelle scrofette trattate con Alliltrembolone il tasso di gravidanza non è stato modificato dal periodo dell'anno in cui il trattamento è effettuato.

Anche nei controlli il tasso di gravidanza è stato simile durante tutto l'anno. Questo in contrasto con molti dati riportati in letteratura dai quali risulta che nel periodo estivo solitamente la fertilità si riduce (Flowers et al., 1989; 1990; Auvigne et al 2010; Xue et al.,1994). Queste differenze nei risultati potrebbero esser dovute al fatto che nell'azienda in cui è stato effettuato il nostro studio c'è un efficiente sistema di controllo della temperatura e questa non ha superato i 29°C durante il periodo estivo. Una temperatura che non si discosta molto dalla temperatura di 25°C che rientra nella zona termo neutrale del suino (Auvigne et al., 2010 Peltoniemi et al., 1999).

Ci sono dati in letteratura che riportano che in Finlandia e nel Nord della Francia durante il periodo estivo la riduzione della fertilità è da imputarsi essenzialmente al fotoperiodo (Peltoniemi et al., 2006; Auvigne et al., 2010). Probabilmente alla latitudine in cui si è svolto il nostro studio, le differenze giornaliere di luce e buio durante il periodo estivo non sono tali da causare un effetto del fotoperiodo sulla fertilità.

Per quanto riguarda la prolificità degli animali trattati con alliltrembolone, vi sono dati che riportano un effetto positivo sul numero di suinetti nati totali (Soede et al., (1995, 1998; Martinat Bottè et al., 1990), ma questo effetto non è sempre riproducibile (Eistenne et al., 2002; Stevenson et al., 1982). Nel nostro studio non sono state osservate delle differenze sul numero totale di suinetti nati nel gruppo AL-18 ma solo una maggiore omogeneità rispetto ai controlli.

Nel gruppo di controllo il numero di suinetti nati è risultato superiore nel periodo Settembre-Novembre rispetto agli altri periodi dell'anno. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che in questa azienda, dato l'efficace controllo della temperatura, il fotoperiodismo possa aver influenzato positivamente il numero di suinetti nati nelle inseminazioni eseguite nel periodo autunnale, un periodo favorevole per la riproduzione nella specie ancestrale del suini, il cinghiale.

In conclusione, il risultato di questo studio è che il tasso di gravidanza ed il numero totale di suinetti nati in scrofette trattate con Alliltrembolone per sincronizzare gli estri non viene modificato dal periodo dell'anno in cui è eseguito il trattamento.

BIBLIOGRAFIA

- Auvigne V., Leneveu, P., Jehannin C., Peltoniemi O, Sallé E. (2010) Seasonal infertility in sows: A five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod. *Theriogenology* 74, 60–66.
- Brink J.T., Karacofe GH. (1988) Effect of oestrus stage at Syncro-mate-B treatment on conception and time to oestrus in cattle. *Theriogenology* 82, 513-518.
- Day B.N. (1984) Estrous cycle regulation. In *Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem.*, Urbana, IL.
- Edwards, R. L., I. T. Omtvedt, I.T., Tuesman E.J., D. F. Stephens D.F., Mahoney, G.W.A. (1968). Reproductive performance of gilts following heat stress prior to breeding and in early gestation. *J Anim Sci.* 27, 1634–1637.
- Estienne, M. J., Harper, A.F., B. R. Horsley, C. E. Estienne, and J. W. Knight. 2001. Effects of P.G. 600 on the onset of estrus and ovulation rate in gilts treated with Regu-mate. *J. Anim. Sci.* 79:2757.
- Flowers, B., T. C. Cantley, Martin, M.J., Day, B.N. (1989). Effect of elevated ambient temperatures on puberty in gilts. *J. Anim. Sci.* 67, 779–784.
- Flowers, B., Day, B.N. (1990). Alterations in gonadotropin secretion and ovarian function in prepubertal gilts by elevated environmental temperature. *Biol. Reprod.* 42, 465–471.
- Garcia-Ispuerto, I., Roselló, M.A., De Rensis, F., López-Gatius F. (2013). A five day progesterone plus eCG based fixed-time AI protocol improves fertility over spontaneous estrus in high-producing dairy cow. *J Reprod Develop* . 59, 544-548.
- Gordon, I. (1997) *Controlled Reproduction in Pigs*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
- Kirkwood, R. N. (1999). Pharmacological intervention in swine reproduction. *Swine Health and Production*. 7, 29-35.
- Koutsotheodoros, F., Hughes P.E., Dunshea, F.R., Fry, R.C., Tilton J.E., (1998). The effects of post-weaning progestagen treatment (Regumate) of early-weaned primiparous sows on subsequent reproductive performance. *Anim Reprod Sci.* 52, 71-79.
- Kraeling, R. R., Dziuk, P.J., Pursel, V.G., Rampacek, G.B., Webel, S.K., (1981). Synchronization of estrus in swine with allyltrenbolone (RU-2267). *J Anim Sci.* 52, 831.
- Love, R.J., Klupiec, C., Thornton, E.J., Evans, G., (1995). An interaction between feeding rate and season affects fertility of sows. *Anim Reprod Sci.* 39, 275–284.
- Martinat-Botte, F., Bariteau, F., Forgerit, Y., Macar, C., Moreau, M., Terqui, J. P. Signoret, J.P. (1989) Control of oestrus in gilts II. Synchronization of oestrus with a progestagen, altrenogest (Regu-mate): effect on fertility and litter size. *Anim Reprod Sci.* 22, 227-233.
- Martinat-Botte, F., Bariteau F., Forgerit, F., Macar, C., Moreau, A., M. Terqui, M., Signoret, J.P. (1990). Control of oestrus in gilts II: Synchronization of oestrus with a progestogen, altrenogest (Regumate): Effect on fertility and litter size. *Anim Reprod Sci.* 22, 227-233.

- Martinat-Botte, F., Bariteau, F., Forgerit, Y., Macar, C., Poirier, P., Terui, P. (1995). Synchronization of oestrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and fetal survival. *Anim Reprod Sci.* 39, 267-274.
- Noble, K.M., Tebble, J.E., Harvey, D., Dobson, H. (200) Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with lowdoses of progesterone in cattle *J Reprod Fert.* 120, 361-366.
- Omtvedt, I. T., Nelson R. E., Edwards, R. L., Stephens, D. F., Turman, E. J. (1971). Influence of heat stress during early, mid and late pregnancy of gilts. *J Anim Sci.* 32, 312-317.
- Peltoniemi, O.A., Heinonen, M., Leppävuori, A., Love, R.J., (1999). Seasonal effects on reproduction in the domestic sow in Finland – A herd record study. *Acta Veterinaria Scandinavica* 40, 133-144.
- Peltoniemi, O.A., Virolainen, J.V., (2006). Seasonality of reproduction in gilts and sows. *Soc Reprod Fertil. Suppl.* 62, 205-218.
- Prunier A, Messias de Braganca M, Le Dividich J. (1997) Influence of high ambient temperature on performance of reproductive sows. *Livest Prod Sci.* 52, 123-133.
- Redmer, D.A., Day B.N. (1981). Ovarian activity and hormonal patterns in gilts fed allyltrenbolone. *J Anim Sci.* 53, 1088-1094.
- Roche JF. (1974a) Effects of short term progesterone treatment on oestrus response and fertility in heifers. *J Reprod Fert.* 40, 433-440.
- Soede, N.M., Wetzels, C.C.H., Zondag, W., De Koning M.A.I., Kemp B. (1995). Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *J Reprod Fertil.* 104, 99-106.
- Soede, N.M., Hazeleger, W., Kemp, B., (1998). Follicle size and the process of ovulation as studied with ultrasound. *Reprod Dom Anim.* 33, 239-244.
- Stevenson, J. S., Davis, D.L. (1982) Estrous synchronization and fertility in gilts after 14- or 18-day feeding of altrenogest beginning at estrus or diestrus. *J. Anim. Sci.* 55, 119.
- Xue, J.L., Dial, G., Marsh, W., Davies, P. (1994) Multiple manifestations of season on reproductive performance of commercial swine. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 204, 1486-1489.
- Webel, S.K., Day, B.N. (1982) The control of ovulation. In *Control of Pig Reproduction*. D.J.A. Cole and G. R. Foxcroft (Eds.). p 197. Butterworths, London, England.
- Wood, C.M., Kornegay, E.T., Shipley, C. F. (1992) Efficacy of altrenogest in synchronizing estrus in two swine breeding programs and effects on subsequent reproductive performance of sows. *J Anim Sci.* 70, 1357-1364.
- Viñoles C., Forsberg, M., Banchemo, G., Rubianes, E. (2001) Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 55, 993-1004.

DIAGNOSI DIRETTA MEDIANTE ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE DI *MYCOPLASMA* SPP. NEL SETTORE SUINICOLO, UN'ULTERIORE POSSIBILITÀ DIAGNOSTICA

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *MYCOPLASMA* spp IN PIS: AN ADDITIONAL DIAGNOSTIC TOOL

CATANIA S.¹, RUBEN S. ROSALES², USTULIN M.¹, FINCATO A.¹, GOBBO F.¹⁻³, VIO D.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10 Legnaro (PD);

²Animal Health and Veterinary Laboratories Agency – Weybridge, Woodham Lane, Addlestone. Surrey KT15 3NB. United Kingdom;

³Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) Università degli Studi di Padova Agripolis, Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia

Parole Chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, Isolamento

Key Words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*, Isolation

Riassunto

Le micoplasmosi rappresentano una importante causa di perdita economica nel settore suinicolo industriale. Attualmente le metodiche diagnostiche maggiormente utilizzate a fini diagnostici risultano essere metodiche di biologia molecolare, capaci di dimostrare esigue quantità di DNA target. L'utilizzo di tecniche altamente sensibili può rappresentare per le attività diagnostiche un potenziale *vulnus*. Su tali basi abbiamo deciso di valutare alcuni casi necroscopici attraverso l'utilizzo di metodiche microbiologiche per valutare la presenza delle differenti specie di micoplasmi e valutare quindi questo metodo come possibile approccio diagnostico alle micoplasmosi. I nostri risultati mostrano una elevata presenza di *M. hyorhinis* nelle porzioni profonde dell'albero respiratorio, mentre per quando *M. hyopneumoniae* solamente in alcuni casi sono state evidenziate positività all'isolamento, infine solamente in un caso è stata rilevata una coinfezione.

In conclusione l'isolamento colturale pur essendo considerato un ottimo metodo diagnostico presenta alcune criticità come i tempi di risposta, i costi, e le difficoltà culturali intrinseche alle specie batteriche ricercate, inoltre necessita di campioni specifici quali i fluidi derivanti dal lavaggio broncoalveolare o porzioni polmonari. Tuttavia l'utilizzo di tale metodica dovrebbe essere contemplata tra le possibilità diagnostiche in campo suino dato che presenta specifiche peculiarità che potrebbero essere sfruttate per meglio capire il ruolo di tali microrganismi nel settore suino.

Summary

Porcine mycoplasmosis are one of the major sources of economic losses for pig producers worldwide.

The diagnostic techniques available up to date are mainly represented by molecular tests that allow us to detect reliably very low quantities of target DNA. However, for diagnostic purposes the utilization of very sensitive tests has its own drawbacks. With that in mind, we decided to study various post-mortem cases in combination with routine mycoplasma isolation in order to evaluate the strengths and weaknesses of molecular methods as part of our diagnostic approach. Our results showed a high presence of *Mycoplasma hyorhinis* in the deeper part of respiratory system in the 24 cases studied, moreover the *M.*

hyopneumoniae was easily detected by PCR methods and in some cases by isolation, and finally only in one case we found a mycoplasma co-infection.

In conclusion the gold standard method used for diagnosis, culture, is difficult and expensive, and more importantly, it requires the use of lung specimens or BAL fluid. Most diagnostic laboratories do not offer this service due to the fastidious growth of mycoplasmas, the time involved (weeks) and the potential for overgrowth by other bacteria. However in many cases the use of culture-based techniques should still be considered as part of routine laboratory investigations for porcine samples because it has specific and important strengths that could be exploited to better understand this complex area.

INTRODUZIONE

Le micoplasmosi rappresentano una delle principali cause di perdita economica nel settore suinicolo industriale. In particolare *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyosynoviae* sono considerati patogeni primari del suino; le infezioni causate da queste due specie di micoplasmi manifestano lesioni anatomopatologiche macroscopiche caratteristiche soprattutto nelle forme croniche. Altre specie di micoplasmi possono infettare il suino, quali per esempio il *M. hyorhinis*, va tuttavia evidenziato che il loro ruolo patogeno non è ancora stato definito chiaramente.

Mycoplasma hyorhinis risulta essere comunemente riscontrato a livello del tratto respiratorio superficiale; recentemente tale microrganismo è stato oggetto di studi che ipotizzano un suo potenziale coinvolgimento nello sviluppo della sindrome respiratoria del suino e in forme di polisierosite in giovani soggetti (Lin et al., 2006; Thacker and Minion, 2012). Sulla base di tali evidenze, risulta interessante capire la diffusione *Mycoplasma hyorhinis* anche nei settori profondi del tratto respiratorio attraverso metodiche microbiologiche colturali finalizzate all'isolamento di questo agente. Ad oggi, nella maggior parte dei laboratori, la diagnosi diretta delle infezioni causate da *Mycoplasma hyopneumoniae* e di *Mycoplasma hyorhinis* è basata su tecniche di biologia molecolare (*in primis* PCR). L'esame colturale con successiva identificazione di specie costituisce unulteriore valido strumento diagnostico di tipo diretto nei confronti dei micoplasmi, tale test permette di conservare il ceppo batterico coinvolto ed inoltre, possedendo una sensibilità minore rispetto ai comuni metodi di tipo biomolecolare, rappresenta un ottimo strumento utilizzabile a fini diagnostici.

L'esame microbiologico colturale per la ricerca di micoplasmi risulta dispendioso sia in termini di tempo (per alcune specie sono necessari tempi di incubazione fino a 4-8 settimane) che in termini di risorse umane, d'altro canto tale test presenta indubbiamente numerosi vantaggi rispetto le comuni metodiche biomolecolari. Il presente contributo vuole evidenziare le caratteristiche di tale metodo diagnostico con i suoi vantaggi ed i suoi limiti, attraverso l'utilizzo di alcuni campioni diagnostici conferiti presso i nostri laboratori.

MATERIALI E METODI

Sono stati sottoposti alla ricerca di micoplasmi con metodica colturale microbiologica e con nested PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* (Calsamiglia et al, 1999) polmoni derivanti da 25 gruppi di suini conferiti per problemi respiratori, e collezionati durante il periodo dicembre 2013 - agosto 2014 presso le Sezioni dell'IZSVe. In particolare, sono stati oggetto di studio i polmoni di suini che, al tavolo autoptico, presentavano lesioni anatomopatologiche sia ascrivibili che non ascrivibili a forme di micoplasmosi classica; oltre ai polmoni sono stati esaminati anche gli organi sede di lesione anatomopatologica di

soggetti che mostravano forme di interessamento delle sierose, in particolare pericarditi, pleuriti ed artriti.

Il prelievo dei campioni da sottoporre alle analisi microbiologiche e biomolecolari sopra menzionate è stato effettuato durante l'esame autoptico; in caso di lesioni polmonari si è proceduto al prelievo mediante tampone del contenuto di un bronchiolo in prossimità delle aree polmonari lesionate. In caso di lesioni articolari il campionamento è stato effettuato direttamente mediante tampone nella sede articolare colpita. Al fine di mantenere la vitalità delle specie di micoplasmi isolabili dal suino e di contenere le contaminazioni dovute ad altri generi batterici a crescita rapida, i campioni che non potevano essere prontamente sottoposti ad analisi, in quanto prelevati in allevamento o conferiti dalle sezioni territoriali, sono stati introdotti in idoneo mezzo di trasporto *homemade* subito dopo il prelievo ed in seguito inviati al laboratorio a temperatura di congelamento o in alternativa a temperatura di refrigerazione solo nel caso in cui potevano essere seminati entro 24 ore.

La procedura di isolamento prevede la semina in due differenti *media* liquidi e successiva incubazione dei brodi inoculati in atmosfera di CO₂ al 5% per almeno 15 giorni. I brodi vengono valutati giornalmente al fine di evidenziare eventuale viraggio o intorbidimento, in tal caso o in alternativa allo scadere dei 15 giorni, questi vengono inoculati nel medesimo terreno agarizzato e incubati alle medesime condizioni. In caso di assenza di attività metabolica si procede ad un reinocolo del brodo di prima semina (secondo passaggio).

Le piastre di terreno agarizzato seminate vengono valutate giornalmente per evidenziare la presenza di eventuali colonie tipiche per almeno 15 giorni, trascorsi i quali sono state considerate negative. In caso di evidenza di crescita si procede alla identificazione di specie mediante metodica DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) (McAuliffe et al., 2003; 2005)

RISULTATI

Sono stati analizzati 25 casi necroscopici considerati sospetti provenienti da 25 allevamenti in cui oltre all'esame colturale per micoplasmi è stata effettuata anche la PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*. Nei gruppi campionati sono inoltre rientrati due casi autoptici di suinetti da 15 giorni provenienti da due diversi allevamenti in cui è stato possibile rilevare lesioni polmonari ed interessamento pericardico.

Dei 25 casi considerati sospetti 24 mostravano lesioni anatomopatologiche a carico del parenchima polmonare, in 7 dei 24 casi sono state rilevate anche forme di pericardite e pleurite. In un solo caso è stato riscontrato un quadro di artrite fibrinosa a livello delle articolazioni del carpo e del tarso, inoltre nel medesimo soggetto è stata rilevata anche una lieve peritonite fibrinosa ed una pericardite fibrinosa di aspetto cronico.

La nested PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* è risultata positiva in 11 casi analizzati, mentre nei rimanenti 13 casi è risultata negativa; nel gruppo con evidenti lesioni articolari non è stata effettuata la PCR per ricerca *M. hyopneumoniae*. L'isolamento colturale è risultato positivo in 15 gruppi ed in particolare sono stati isolati *Mycoplasma hyorhinis* (12 positivi), *Mycoplasma hyopneumoniae* (3 positivi), *Mycoplasma arginini* (1 positivo), *Mycoplasma alkalescens* (1 positivo). Solamente in un caso è stata riscontrata la positività per due differenti specie di micoplasma e nello specifico si trattava di una coinfezione tra *Mycoplasma hyorhinis* e *Mycoplasma arginini*. Inoltre solamente in un caso l'esame microbiologico non ha dato risultati utili in quanto contaminato da specie batteriche non appartenenti al genere *Mycoplasma spp.*. In Tabella 1 vengono riassunti i risultati delle indagini effettuate.

Tabella 1. Schema riassuntivo dei casi oggetto dello studio. (Legenda: 1 presenza di lesioni/positivo; 0 assenza di lesione/negativo, A articolazioni; B Bronchiolo; ND, non testato; **In grassetto i dati riguardanti i due gruppi di suini di 15 giorni**)

Caso	Lesioni Polmonari	Lesioni a carico delle sierose	Sito del prelievo	PCR per <i>M. hyopneumoniae</i>	Isolamento ed identificazione di specie
1	1	0	B	1	<i>M. alkalescens</i>
2	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>
3	1	1	B	1	<i>M. hyorhinitis</i> ; <i>M. arginini</i>
4	1	0	B	1	Negativo
5	1	0	B	1	Negativo
6	1	0	B	0	Negativo
7	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
8	1	0	B	1	<i>M. hyorhinitis</i>
9	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
10	1	1	B	0	Negativo
11	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
12	1	ND	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
13	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
14	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
15	0	1	A	nd	<i>M. hyorhinitis</i>
16	1	1	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
17	1	0	B	0	Negativo
18	1	0	B	1	Negativo
19	1	0	B	0	Negativo
20	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
21	1	0	B	1	Inquinato
22	1	0	B	0	<i>M. hyorhinitis</i>
23	1	0	B	1	Negativo
24	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>
25	1	0	B	1	<i>M. hyopneumoniae</i>

CONCLUSIONI

La ricerca di micoplasmi mediante isolamento microbiologico, anche se risulta essere una metodica dispendiosa sia in termini di tempo per l'esecuzione delle analisi che di risorse umane da impiegare, permette di evidenziare tutte le specie di micoplasmi isolabili *in vitro*. Tale caratteristica risulta essere molto importante dal punto di vista diagnostico in quanto permette di mostrare la presenza di specie di micoplasmi per i quali non sono disponibili metodiche di biologia molecolare o in casi in cui il sospetto clinico-anamnestico diagnostico non sia chiaro e pertanto risulti sconsigliato l'utilizzo di una metodica ad alta sensibilità come la PCR. Un'altra importante caratteristica della ricerca di micoplasmi mediante isolamento microbiologico, non direttamente correlata con la diagnosi primaria, risiede nella possibilità di ottenere un ceppo batterico vivo da poter sottoporre ad ulteriori indagini, quali per esempio lo studio della farmaco sensibilità tramite determinazione della M.I.C. (Minimum Inhibitory Concentration), alcune tipizzazioni genetiche con tecniche biomolecolari ed infezioni sperimentali.

I risultati di questo studio evidenziano che nella maggior parte dei campioni esaminati (15/24, 62.5%), prelevati nelle porzioni profonde dell'albero respiratorio, è stato possibile isolare almeno una specie di micoplasma. Considerata la non elevata sensibilità del metodo, nettamente inferiore a quella delle metodiche biomolecolari, si può ipotizzare che tale tasso di isolamento possa essere dovuto alla presenza in elevata quantità di micoplasmi vitali nel punto di prelievo. Tale ipotesi è rafforzata dalla valutazione del numero degli isolamenti negativi per *M. hyopneumoniae* in campioni risultati positivi alla nested-PCR per tale micoplasma, in ben 5 casi la nested-PCR ha dato esito positivo mentre l'isolamento non è stato in grado di evidenziare il patogeno: tale apparente discrepanza può essere attribuita ad una scarsa quantità di micoplasmi vitali nel punto di prelievo, alla presenza di sostanze inibenti che non permettono il mantenimento della vitalità degli stessi, oppure ad una non ottimale conservazione del campione. Si segnala inoltre che solamente in un caso necroscopico l'esame colturale per micoplasmi è risultato contaminato.

E' interessante sottolineare che in 11 campioni su 24 (45.8%) il *Mycoplasma hyorhinis* è stato isolato in porzioni polmonari lesionate delle quali solamente 2 sono risultate positive alla nested-PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*; questo dato necessita sicuramente di maggiori approfondimenti per chiarire il ruolo di questa specie di micoplasma nei casi di patologia respiratoria del suino. Un altro dato, a nostro parere particolarmente interessante è l'isolamento di *M. hyorhinis* da polmoni di soggetti di 15 giorni di vita appartenenti a due allevamenti distinti presentanti forma respiratoria e negatività alla PCR *M. hyopneumoniae* da polmone; tale dato ci conferma che, almeno per il *Mycoplasma hyorhinis*, la circolazione all'interno del gruppo può essere alquanto precoce e che sono necessari ulteriori studi per capire le dinamiche dell'infezione causata da *Mycoplasma hyorhinis* ed eventualmente evidenziare le potenzialità patologiche di questo agente.

L'isolamento di *Mycoplasma hyorhinis* dalle articolazioni di soggetti con polisierosite conferma le precedenti segnalazioni riguardanti tale microrganismo (Friis and Feenstra 1994; Thacker and Minion, 2012; Gomes Neto et al., 2012).

In conclusione possiamo affermare che l'isolamento microbiologico dei micoplasmi permette di aumentare il ventaglio delle conoscenze a disposizione del diagnosa, e visto che come dimostrato per il settore del pollame questi microrganismi dimostrano una elevata adattabilità ai settori zootecnici altamente industrializzati, l'utilizzo di tali metodi laboratoristici può rappresentare un valido ausilio per l'incremento delle conoscenze delle micoplasmosi nel settore suinicolo.

BIBLIOGRAFIA

Calsamiglia M., Pijoan C., Trigo A. (1999) "Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs". J Vet Diagn Invest. May;11(3):246-51.

Friis, N.F., Feenstra, A.A. (1994) "Mycoplasma hyorhinis in the etiology of serositis among piglets". Acta Vet. Scand. 35, 93–98

Gomes Neto J.C., Gauger P.C., Strait E.L., et al. (2012) Mycoplasma-associated arthritis: Critical points for diagnosis. J Swine Health Prod. 20(2):82-86.

Lin J.H., Chen S.P., Yeh K.S., Weng C.N. (2006) "Mycoplasma hyorhinis in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen". Vet Microbiol. Jun 15;115(1-3):111-6. Epub 2006 Mar 15.

McAuliffe L., Ellis R. J., Ayling R. D., Nicholas R. A. (2003) "Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting". Journal of Clinical Microbiology. 41, 4844-4847.

McAuliffe L., Ellis R. J., Lawes J. R., Ayling R. D., Nicholas R. A. (2005) "16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for the detecting and differentiating mycoplasma species. Journal of Medical Microbiology". 54,731-739.

Thacker, E.L., Minion, F.C., (2012). "Mycoplasmosis". In: Diseases of Swine, Zimmerman, J., Karriker, L., Ramirez, A., Schwartz, K., Stevenson, G. (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Hoboken. Tenth Edition. p 779-797.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI MELOXICAM ALLE SCROFE NEL POST PARTO: VIA INTRAMUSCOLARE *VERSUS* VIA ORALE

EFFECT OF MELOXICAM ADMINISTRATION TO SOWS AFTER FARROWING: INTRAMUSCULAR *VERSUS* ORAL ROUTE

SCOLLO A.^{1,2}, ORTOLAN T.², TONON F.², VELOCI M.², MAZZON, C.²

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

² SUIVET Corresponding author: scollo@suivet.it

Parole chiave: scrofa, meloxicam, orale, parto.

Key words: sow, meloxicam, oral, farrowing.

Riassunto

Nelle scrofe, il meloxicam è largamente impiegato per ridurre infiammazione, dolore ed edema mammario nel post parto. Scopo del presente lavoro è stato paragonare la via intramuscolare e la via orale, valutando gli affetti del meloxicam sui parametri produttivi della scrofa e della nidiata, con particolare attenzione alle scrofe che avevano presentato problemi al parto. Per la prova sono state utilizzate 82 scrofe, divise in tre gruppi: controllo (27 scrofe non trattate), meloxicam per via intramuscolare nel post parto (27 scrofe), meloxicam per via orale nel post parto (28 scrofe). La somministrazione di meloxicam (sia intramuscolare che orale) ha determinato un trend di maggiore diminuzione della temperatura rettale nei gruppi di scrofe che avevano ricevuto ossitocina ($P = 0,03$), con nati morti ($P = 0,08$), mummificati ($P = 0,07$), o esplorate durante il parto ($P = 0,09$). Ha inoltre determinato una tendenza ad un maggiore peso della nidiata allo svezzamento nelle scrofe con febbre al parto ($P = 0,09$). Le scrofe trattate per via orale hanno avuto meno suinetti schiacciati nei primi 3 giorni dalla nascita ($P = 0,05$). In conclusione, lo studio conferma l'efficacia del meloxicam nel ridurre la febbre post parto nelle scrofe con problemi al parto. La via orale sembra essere efficace quanto la via intramuscolare ma provoca anche una riduzione del numero di schiacciati nei primi tre giorni di vita, suggerendo la riduzione di comportamenti espressione di stress nella scrofa.

Abstract

Meloxicam in sows is greatly used for the reduction of inflammation, pain and edema post farrowing. Aim of the present work was compared intramuscular and the oral routes of administration. Productive parameters of sows and litter have been investigated, especially in sows with farrowing problems. Eighty-two sows and their litter were involved in the study, for three treatment groups: control (27 not treated sows), intramuscular meloxicam post farrowing (27 sows) and oral meloxicam post farrowing (28 sows). Both intramuscular and oral routes showed a trend of fever reduction in sows received oxytocin ($P = 0,03$), with stillborns ($P = 0,08$), mummified ($P = 0,07$), or explored during farrowing ($P = 0,09$). Furthermore, a tendency to a greater weaning weight of litter ($P = 0,09$) belonging to sows with fever was showed. Sows treated with the oral route showed reduced number of crushed piglets during the first three days of life. In conclusion, the study confirm the effectiveness of both intramuscular and oral routes of meloxicam, but the latter improved the piglet survivor for crushing at the beginning of lactation.

INTRODUZIONE

In Europa il meloxicam è ampiamente utilizzato nei suini per il trattamento delle patologie di tipo non infettivo dell'apparato locomotore (Friton et al., 2003), e per il sollievo del dolore post-operatorio in seguito alla chirurgia dei tessuti molli come la castrazione (Keita et al., 2010). Tuttavia l'impiego maggiore è forse nelle scrofe, per le quali il meloxicam viene utilizzato come terapia di supporto per il trattamento sindrome mastite-metrite-agalassia-(MMA) in associazione agli appropriati antibiotici (Hirsch et al., 2003). Gli effetti del principio attivo sono principalmente antinfiammatori, analgesici ed antipiretici, oltre che antiedemigeni. La sua somministrazione in sala parto è mirata al miglioramento del benessere delle scrofe, ma anche della loro produttività lattifera e della conseguente sopravvivenza e crescita dei suinetti (Alonso-Spilsbury et al., 2005). Sebbene siano disponibili alcuni lavori che hanno approfondito gli effetti del meloxicam per via intramuscolare sulle scrofe in sala parto, sono assenti studi condotti utilizzando il principio attivo per via orale. Scopo del presente lavoro è stato paragonare la via intramuscolare e la via orale, valutando gli affetti del meloxicam sui parametri produttivi della scrofa e della nidiata. Inoltre, l'indagine è stata approfondita nelle scrofe con problemi al parto, con l'intento di evidenziare le categorie di animali più a rischio di perdite produttive.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Per la prova sono state utilizzate 82 scrofe di genetica ibrida commerciale, situate in un allevamento a ciclo aperto nel nord est italiano. L'ordine di parto degli animali era da un minimo di uno (primipare) ad un massimo di 12. Le scrofe sono entrate in sala parto 5 giorni prima della data prevista del parto. Il giorno del parto venivano suddivise in tre gruppi di trattamento, bilanciando gli ordini di parto all'interno di ciascun gruppo: controllo (CTRL, 27 scrofe; nessuna somministrazione di FANS nel peri-parto), meloxicam per via intramuscolare (IM, 27 scrofe; somministrazione di Metacam® per via intramuscolare alla fine del parto, al dosaggio di 2,0 ml/100 kg di peso corporeo), meloxicam per via orale (XOS, 28 scrofe; somministrazione di Metacam® per via orale alla fine del parto, al dosaggio di 2,7 ml/100 kg di peso corporeo).

Parametri valutati

Nella scrofa sono state registrate le performance legate al parto per poter categorizzare le classi di rischio: numero di parti della scrofa, durata totale del parto, numero di nati morti, numero di nati totali, numero di mummificati, numero di esplorazioni necessarie durante l'assistenza al parto, ed interventi farmacologici nel peri-parto (ossitocina).

Il giorno del parto, ad ogni scrofa è stata misurata la temperatura rettale, lo spessore del lardo dorsale in posizione P2 (Renco Lean-Meater, S.E.C. Repro Inc, Canada), e l'ulcera della spalla (Jensen, 2009). Una seconda misurazione è stata effettuata dopo 24 ore per la temperatura, e allo svezzamento per lo spessore del lardo e l'ulcera della spalla.

Della nidiata sono state registrate il peso alla nascita, il peso allo svezzamento, e la sopravvivenza degli animali suddivisa in tre periodi della lattazione: 0-3 giorni, 4-8 giorni e 9-21 giorni. La causa di morte è stata classificata come "schiacciamento" oppure "altro".

Analisi statistica

Ciascuna variabile è stata valutata con un'analisi della varianza (ANOVA) sia per la variabile indipendente del gruppo del trattamento, che per le sue interazioni con le categorie di scrofe a rischio: febbre (scrofe con temperatura rettale al parto $>39^{\circ}\text{C}$), nati morti (scrofe con almeno un suinetto nato morto durante il parto osservato), mummificati (scrofe con almeno un suinetto nato mummificato durante il parto osservato), età (scrofe con almeno o più di

7 parti), condizione corporea (scrofe molto magre con $P2 \leq 5$; scrofe grasse con $P2 \geq 10$), esplorazioni (scrofe che hanno avuto la necessità di almeno una esplorazione durante il parto osservato), ossitocina (scrofe che hanno avuto la necessità di almeno una somministrazione di ossitocina durante il parto osservato).

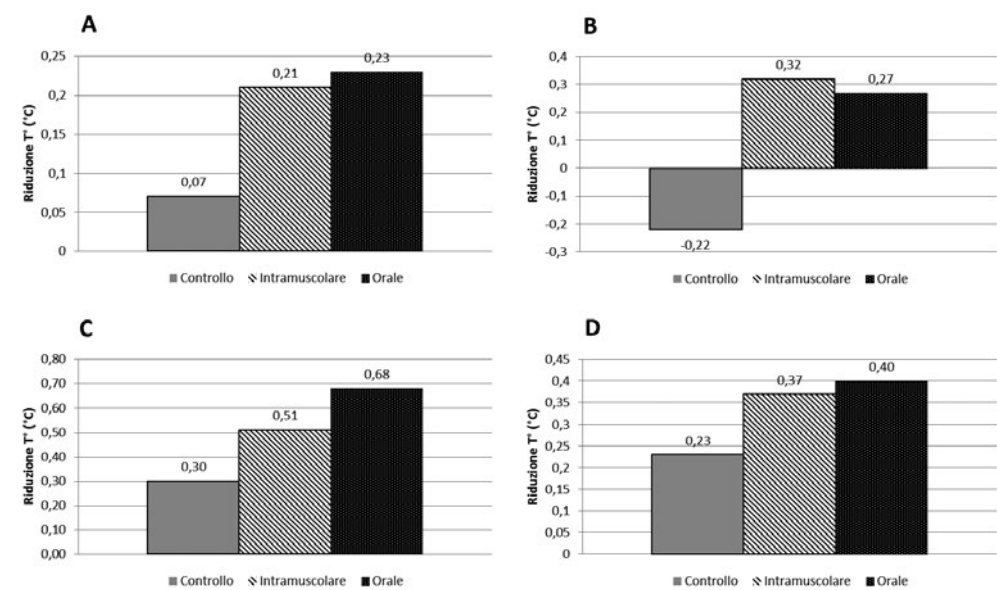


Figura 1. Riduzione media della temperatura rettale dal giorno del parto alle 24 ore successive nelle scrofe delle categorie a rischio. A) scrofe che hanno avuto la necessità di almeno una somministrazione di ossitocina durante il parto osservato; B) scrofe con almeno un suinetto nato morto durante il parto osservato; C) scrofe con almeno un suinetto nato mummificato durante il parto osservato; D) scrofe che hanno avuto la necessità di almeno una esplorazione durante il parto osservato.

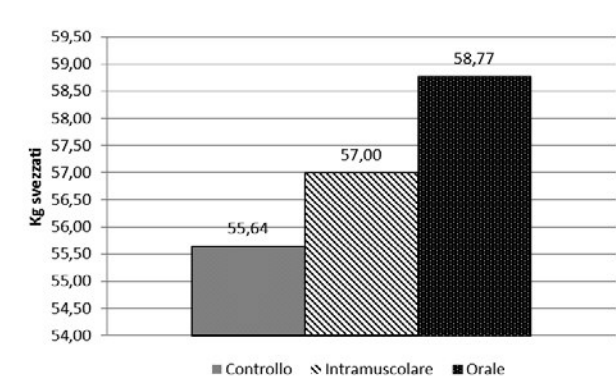


Figura 2. Media dei Kg di peso allo svezzamento delle nidiate appartenenti alle scrofe con febbre al parto.

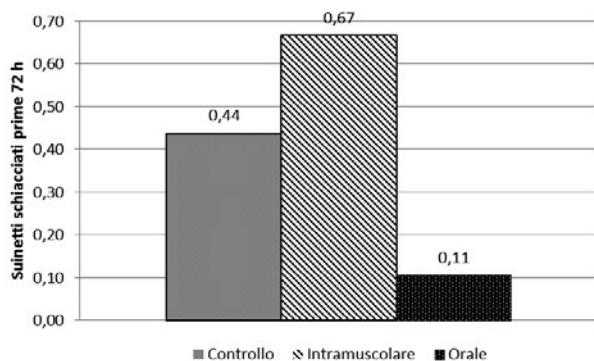


Figura 3. Media dei suinetti morti per schiacciamento in ciascuna nidiata nei primi 3 giorni di vita.

RISULTATI

La somministrazione di meloxicam (sia intramuscolare che orale) ha determinato un trend di maggiore diminuzione della temperatura rettale nei gruppi di scrofe a rischio: ossitocina ($P = 0,03$), nati morti ($P = 0,08$), mummificati ($P = 0,07$), ed esplorazioni ($P = 0,09$) (Fig. 1A, 1B, 1C ed 1D). Ha inoltre determinato una tendenza ad un maggiore peso della nidiata allo svezzamento nelle scrofe con febbre al parto ($P = 0,09$) (Fig. 2). Le scrofe trattate con meloxicam orale hanno avute meno perdite rispetto a quelle tratta per via intramuscolare e quelle del gruppo controllo in termini di numero di suinetti schiacciati nei primi 3 giorni dalla nascita ($P = 0,05$) (Fig. 3).

DISCUSSIONE

Negli ultimi anni, le ricerche nel campo della produttività in sala parto si sono rivolte parecchio all'approfondimento dei fattori che possono influire sull'adeguata produzione di latte della scrofa, con lo scopo di migliorare il tasso di crescita dei suinetti e ridurne la mortalità durante la lattazione (Kemper e Gerjets, 2009; Papadopoulos et al., 2010). In particolare, sono stati approfonditi gli aspetti di scarsa salute e di ridotto appetito nella scrofa subito dopo il parto che sono responsabili dell'insorgenza di disordini quali la PDS (postpartum dysgalactia syndrome) e la MMA (mastitis metritis agalactia). Questi disordini hanno solitamente inizio nelle prime 24 ore dopo il parto e sono accompagnati da diversi sintomi clinici, tra cui degli eccessivi scoli vulvari e lo scarso appetito, che inevitabilmente si accompagnano all'aumento della temperatura rettale. In bibliografia è riportato come alcune categorie di scrofe siano maggiormente a rischio di tali disordini, e che l'insorgenza di febbre si verifica soprattutto nelle primipare e negli animali con una lunga durata del parto. L'elevata temperatura corporea che persiste nelle prime ore dalla fine del parto va considerato un fenomeno parzialmente associato alla normale fisiologia (King et al., 1972). Tuttavia, quando la temperatura sale oltre i 39°C (Tummaruk e Sang-Gassanee, 2013), una buona parte della responsabilità va attribuita alla presenza di endotossine batteriche (Hirsch et al., 2003) che possono interferire pesantemente anche con la produzione di prolattina da parte della scrofa (Smith e Wagner, 1985). Nel presente lavoro sono state selezionate delle categorie di scrofe a rischio di disordini, monitorandone la riduzione della temperatura corporea nelle successive 24 ore post parto. I risultati hanno evidenziato una buona efficacia del meloxicam nel far calare la temperatura a livelli fisiologici nel post parto delle scrofe che avevano avuto la necessità di almeno una somministrazione di ossitocina, che avevano espulso almeno un suinetto nato morto o mummificato, e che avevano richiesto

almeno una esplorazione uterina durante il parto. Queste categorie di scrofe a rischio sono potenzialmente riconducibili a scrofe con una durata del parto più lunga del normale, sebbene non sia stato possibile ottenere il dato nel presente lavoro. Ad ogni modo, i risultati confermano l'attività antipiretica del meloxicam nel post parto, sia tramite una somministrazione per via intramuscolare che per via orale. Inoltre, il riscontro nel presente lavoro di nidiate con peso maggiore allo svezzamento in caso di somministrazione di meloxicam alle scrofe con febbre al parto conferma quanto già descritto da Martineau et al. nel 2013. La presenza di febbre infatti rappresenta un sintomo di disordini post parto, così come uno scarso accrescimento della nidiate ne rappresenta la conseguenza.

Nel presente lavoro è emersa una evidente differenza tra gruppi di trattamento nel numero di suinetti morti schiacciati durante i primi tre giorni di vita. Inaspettatamente, il gruppo trattato con meloxicam per via orale è stato l'unico a presentare una netta diminuzione della mortalità. Il riscontro di una maggiore mortalità per schiacciamento nei primi tre giorni di vita è descritto da numerosi studi precedenti (Barnett et al., 2001; English e Smith, 1975), ed altrettanti ne attribuiscono la causa prevalentemente allo schiacciamento ed alla denutrizione (Alonso-Spilsbury et al., 2007). Tuttavia, come nel presente lavoro, Mainau et al. (2012) non osservano alcuna differenza nel numero di schiacciati nelle scrofe trattate con meloxicam per via intramuscolare. La via orale sembra invece migliorare il dato, suggerendo che un intervento meno invasivo rispetto a quello parenterale possa rappresentare ridurre nella scrofa i cambi di posizione ed i movimenti causa di schiacciamento. Sebbene siano mancanti in bibliografia dei dati correlabili al benessere della scrofa a seguito di iniezione intramuscolare ottenuti dall'osservazione del comportamento, è opportuno avanzare l'ipotesi che questa rappresenti un intervento invasivo a sufficienza per determinare un momentaneo nervosismo dell'animale. Inoltre, studi condotti su scrofe alle quali era stato somministrato ketoprofene per via intramuscolare hanno evidenziato un aumento di aspartato aminotransferasi sierica (AST) e di creatin chinasi sierica (CK) il quinto giorno post iniezione piuttosto che nel gruppo iniettato con soluzione salina (Viitasaari et al., 2013). L'aumento di questi enzimi si osserva fisiologicamente durante il parto (Nogueira et al., 2000; Nathwani et al., 2005), ma è risultato essere maggiore in caso di ketoprofene probabilmente a causa dell'irritazione locale provocata e della conseguente degradazione di cellule muscolari (Pyorala et al., 1999; Nathwani et al., 2005; Verheyen et al., 2007). Come suggerito da Viitasaari et al. (2013) per il ketoprofene, la somministrazione di meloxicam per via orale può rappresentare una alternativa animal-friendly alla via intramuscolare.

In conclusione, lo studio conferma l'efficacia del meloxicam nel ridurre la febbre post parto nelle scrofe appartenenti a categorie a rischio. La via orale sembra essere efficace quanto la via intramuscolare ma provoca anche una riduzione del numero di suinetti schiacciati nei primi tre giorni di vita, suggerendo la riduzione di comportamenti espressione di stress nella scrofa. La corretta selezione delle scrofe per le quali preferire la via orale piuttosto che la intramuscolare può rappresentare un mezzo per il miglioramento del benessere animale e delle performance in sala parto.

BIBLIOGRAFIA

Alonso-Spilsbury M, Mota-Rojas D, Villanueva-Garcia D, Marti'nez-Burnes J, Orozco H, Ramirez-Necoechea R, Lopez MA and Trujillo ME 2005. Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review. *Animal Reproduction Science* 90, 1–30.

Alonso-Spilsbury M, Ramirez-Necoechea R, Gonzalez-Lozano M, Mota-Rojas D and Trujillo-Ortega ME 2007. Piglet survival in early lactation: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 6, 76–86.

Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM, Jongman EC and Hutson GD 2001. A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing. *Australian Journal of Agricultural Research* 52, 1–28.

English PR and Smith WJ 1975. Some causes of death in neonatal piglets. *Veterinary Annual* 15, 95–114.

Friton GM, Philipp H, Schneider T and Kleemann R 2003. Investigation on the clinical efficacy and safety of meloxicam (Metacam) in the treatment of noninfectious locomotor disorders in pigs. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 116, 421–426.

Hirsch AC, Philipp H and Kleemann R 2003. Investigation on the efficacy of meloxicam in sows with mastitis–metritis–agalactia syndrome. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 26, 355–360.

Jensen HE 2009. Investigation into the pathology of shoulder ulcerations in sows. *Veterinary Record* 165, 171–174.

Keita A, Pagot E, Prunier A and Guidarini Ch 2010. Pre-emptive meloxicam for postoperative analgesia in piglets undergoing surgical castration. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 37, 367–374.

Kemper, N. and Gerjets, I., 2009. Bacteria in milk from anterior and posterior mammary glands in sows affected and unaffected by postpartum dysgalactia syndrome (PPDS). *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51, 26.

King GJ, Willoughby RA and Hacker RR 1972. Fluctuations in rectal temperature of swine at parturition. *The Canadian Veterinary Journal* 13, 72–74.

Mainau, E., J. L. Ruiz-de-la-Torre, A. Dalmau, J. M. Salleras, X. Manteca, 2012. Effects of meloxicam (Metacam) on post-farrowing sow behaviour and piglet performance. *Animal* (2012), 6:3, pp 494–501.

Martineau, G.P., Le Treut, Y., Guillou, D., Waret-Szkuta, A., 2013. Postpartum dysgalactia syndrome: a simple change in homeorhesis? *Journal of Swine Health and Production*, 21, 2.

Nathwani, R.A., Pais, S., Reynolds, T.B., Kaplowitz, N., 2005. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases. *Hepatology* 41, 380–382.

Nogueira, R.H.G., Guedes, R.M.C., Souza, J.C.A., 2000. Serum concentrations of creatinine kinase and of triglycerides during lactation in gilts bred older and in multiparous sows fed ad libitum. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 52, 65–67.

Papadopoulos, G.A., Vanderhaeghe, C., Janssens, G.P.J., Dewulf, J. and Maes, D.G.D., 2010. Risk factors associated with postpartum dysgalactia syndrome in sows. *The Veterinary Journal*, 184, 167–171.

Pyörälä, S., Laurila, T., Lehtonen, S., Leppä, S., Kaartinen, L., 1999. Local tissue damage in cows after intramuscular administration of preparations containing phenylbutazone, flunixin, ketoprofen and metamizole. *Acta Veterinaria Scandinavica* 40, 145–150.

Smith, B.B. and Wagner, W.C., 1985. Effect of *Escherichia coli* endotoxin and thyrotropin-releasing hormone on prolactin in lactating sows. *American Journal of Veterinary Research*, 46, 175–180.

Tummaruk, P., Sang-Gassanee, K., 2013. Effect of farrowing duration, parity number and the type of anti-inflammatory drug on postparturient disorders in sows: a clinical study. *Trop Anim Health Prod* (2013) 45:1071–1077.

Verheyen, A.J.M., Maes, D.G.D., Mateusen, B., Deprez, P., Janssen, G.P.J., de Lange, L., Counotte, G., 2007. Serum biochemical reference values for gestating and lactating sows. *The Veterinary Journal* 174, 92–98.

Viitasari, E., Hänninen, L., Heinonen, M., Raekallio, M., Orro, T., Peltoniemi, O., & Valros, A. (2013). Effects of post-partum administration of ketoprofen on sow health and piglet growth. *The Veterinary Journal*, 198(1), 153–157.

EFFETTO E DURATA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN VACCINO PER LA CASTRAZIONE IMMUNOLOGICA A SCROFE PUBERI. INDAGINE PRELIMINARE

EFFECT AND DURATION OF ANTI-GnRH VACCINE IN PUBESCENT SOW: PRELIMINARY INVESTIGATION

TONON F.^{1,2}, STELLETTA C.², SCOLLO A.^{1,2}, VENCATO J.², ROMAGNOLI S.²

¹ *Suivet*; ² *Dipartimento MAPS, Università di Padova*

Parole chiave: castrazione immunologica, scrofa, efficacia

Key words: Immunological castration, sow, efficacy

Riassunto

L'efficacia del vaccino anti GnRH è descritta soprattutto per i verri. L'uso di questo tipo di castrazione è considerata come alternativa alla chirurgica ed è effettuata per diminuire l'odore della carne e per aumentare le performance in termini di ingestione alimentare e deposito di grasso. L'approccio chirurgico per le femmine era considerato storicamente ma per la castrazione immunologica si hanno ancora poche informazioni di effetto sui parametri riproduttivi e produttivi. Lo scopo di questo studio è stato quello di applicare un metodo di monitoraggio integrato per valutare l'efficacia di un vaccino anti-GnRH fino a 17 settimane dopo il trattamento. Le scrofe sono state suddivise in due gruppi (Gruppo vaccinato T di 7 soggetti e gruppo non vaccinato C di 6 soggetti). I livelli circolanti di progesterone (P4) ed estrogeni (E2) sono stati valutati durante il periodo della doppia somministrazione di vaccino e fino alla 5° settimana dopo la fine del protocollo. Le ovaie di coppie di scrofe (1 T e 1 C) sono state valutate macroscopicamente fino alla 17° settimana post vaccinazione. Il P4 mostra valori minimi in tutti i casi di animali vaccinati alla 5° settimana post vaccino mentre gli E2 non mostrano variazioni significative. Parametri produttivi come l'incremento di peso alla macellazione tra i due gruppi danno una positiva indicazione per l'utilizzo della castrazione immunologica nelle scrofe puberi.

Abstract

The efficacy of the antiGnRH vaccine is described above all on the boar. The use of this type of castration is aimed at decreasing the negative taint effect and increasing the performance in terms of feed intake and fat deposition. The surgical approach on the female has also been considered historically but few reports describe the effect of antiGnRH vaccine on reproductive and productive parameters. The aim of this study was to evaluate the effect of immunological castration using an anti-GnRH vaccine on puberal sows monitored up to 17 weeks after the vaccine protocol end. Sows were divided in two groups (group vaccinated T: 7 animals and group not vaccinated C: 6 animals). Progesterone (P4) and estrogens (E2) serum levels were evaluated during the period of the double vaccine administration and up to 5 weeks after the 2nd administration. Ovaries from a couple of T and C animals were macroscopically compared starting from 10 weeks after the vaccination protocol and up to 17 weeks. P4 concentrations at 5 weeks after vaccination decreased in T while the E2 did not vary significantly between groups. Productive parameters as the body weight gain after the conclusion of the vaccination give an indication of a positive use of the antiGnRH vaccine in puberal sows.

INTRODUZIONE

La castrazione delle femmine era una pratica molto diffusa quando l'allevamento del suino era ancora per larga parte praticato a livello familiare: questo consentiva di influenzare l'accrescimento (più rapido), la deposizione di grasso (maggiore) e la programmazione della macellazione domiciliare, poiché l'estro conclamato poteva pregiudicare le qualità organolettiche degli insaccati (Tonon & Gherpelli, 1999). La disponibilità di un vaccino antiGnRH commercializzato per la castrazione dei maschi ha fatto aumentare l'interesse dell'uso di tale prodotto anche per le femmine. Il vaccino consiste in una molecola di GnRH con un adiuvante costituito da un tossoide difterico che catalizza la risposta immunitaria. Dopo la seconda somministrazione di tale vaccino si ha una produzione di anticorpi antiGnRH che impediscono il normale funzionamento dell'asse ipofisi-ipotalamo-gonadico causando il blocco di funzionalità gonadica (Font-i-Furnols et al., 2012). La durata dell'azione di tale vaccino è stata valutata nei maschi dove si stima l'effetto fino a 215 giorni di vita (ca. 140 Kg p.v.) e a 42 giorni dal termine del protocollo vaccinale mentre ci sono informazioni sull'efficacia nelle scrofe fino al peso di 140 kg di peso vivo (Muya E.F., 2011). Scopo del lavoro è stato quello di definire la durata dell'azione della castrazione immunologica attraverso un monitoraggio integrato fino alla 17° settimana dopo la fine del protocollo vaccinale.

MATERIALI E METODI

Sono state selezionate 14 scrofette provenienti da un centro genetico con un peso medio di 79,3 Kg p.v.. Gli animali sono stati allevati tutti all'interno dello stesso box, costituito da una parte interna a pavimentazione continua ed un corridoio esterno a pavimentazione fessurata. L'alimentazione veniva effettuata una volta al giorno, con mangime commerciale distribuito manualmente sul pavimento del box, prestando particolare attenzione ad una distribuzione uniforme, per dar modo agli animali di alimentarsi contemporaneamente e ridurre al minimo la competizione alimentare. Dopo il periodo di adattamento, a due settimane le scrofette sono state identificate con un numero progressivo da 1 a 14. Il protocollo vaccinale è iniziato alla 23° settimana ed è terminato alla 28° settimana di allevamento con la somministrazione della seconda dose di vaccino (Improvac®) ed ha compreso soltanto le scrofe identificate con numero dispari mentre le restanti sono state considerate come controllo. Dopo il termine del protocollo le scrofe sono state monitorate a 33 settimane (5* settimana post vaccinazione) e fino a 45 settimane d'allevamento. Al momento della somministrazione delle dosi vaccinali e alla 5° settimana post trattamento sono stati valutati i livelli sierici di progesterone (P4) ed estrogeni (E2) con metodica in chemiluminescenza. Inoltre a partire dalla 11° settimana post vaccino sono state macellate coppie di scrofe provenienti dai due gruppi comparando le ovaie derivanti da ognuno dei soggetti. All'inizio delle fasi di macellazione (40° settimana di allevamento e 11° post vaccinazione) tutte le scrofe sono state pesate. Le coppie di scrofe (T e C) sono state monitorate in fase di macellazione settimanalmente fino alla 17° settimana post-vaccinazione. I dati ottenuti sono stati elaborati tramite l'uso di Excel considerando le distanze temporali dalla seconda dose vaccinale (T0). Le scrofe dei due gruppi che a T0 presentavano un livello di progesterone >15 ng/ml sono state considerate in fase luteale (TL e CL) mentre le rimanenti sono state considerate in fase follicolare (TF e CF).

RISULTATI

Nel grafico 1 vengono riportati i valori medi di P4, E2 e E2/P4 nei 4 gruppi di animali considerati. Il livello di P4 è risultato significativamente differente alla 5° settimana post vaccino indipendentemente dallo stadio ovarico al momento della seconda dose di trattamento. A partire dalla decima settimana alla macellazione si sono comparate le ovaie delle coppie di scrofe provenienti dai due gruppi identificando la completa e continuativa presenza di una condizione di ipoplasia ovarica bilaterale che si è mantenuta fino alla 17° settimana dopo la fine del trattamento (figura 1.).

Grafico 1. Variazioni dei livelli di progesteronemia (P4), estrogenemia (E2) e del rapporto E2/P4 durante il periodo della vaccinazione e fino alla 5° settimana post trattamento sia nelle scrofe vaccinate (T) sia nelle controllo (C) suddivise in dipendenza della fase ovarica (F e L) al momento della somministrazione della seconda dose di vaccino Anti-GnRH.

Graphic 1. Variations of Progesterone (P4), Estrogens (E2) and E2/P4 during the vaccination period and up to the 5th weeks after the 2nd administration of the vaccine dose in both groups of sow (T and C) divided depending on the ovarian phase (F and L) at the end of the vaccination protocol.

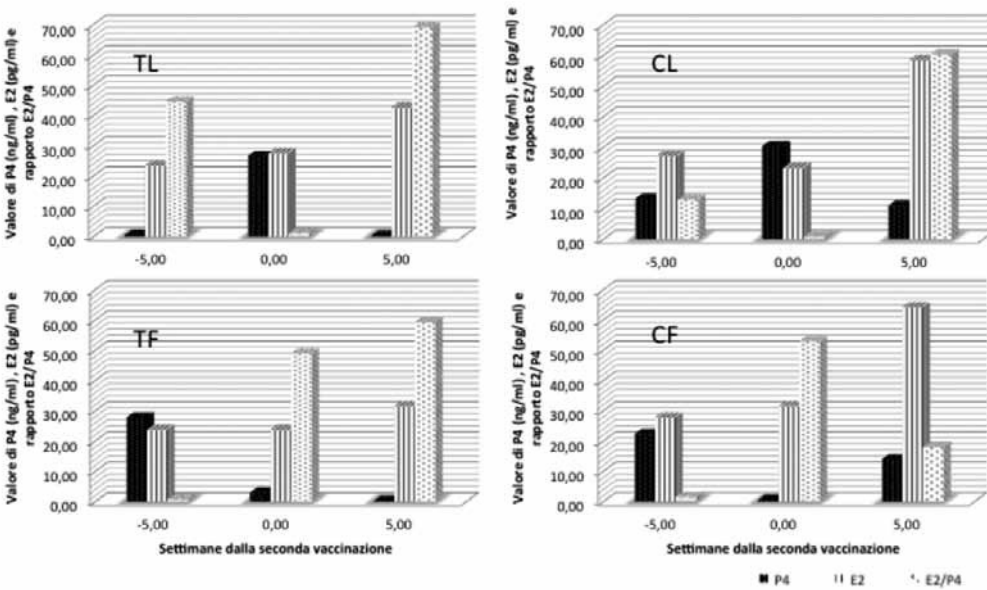
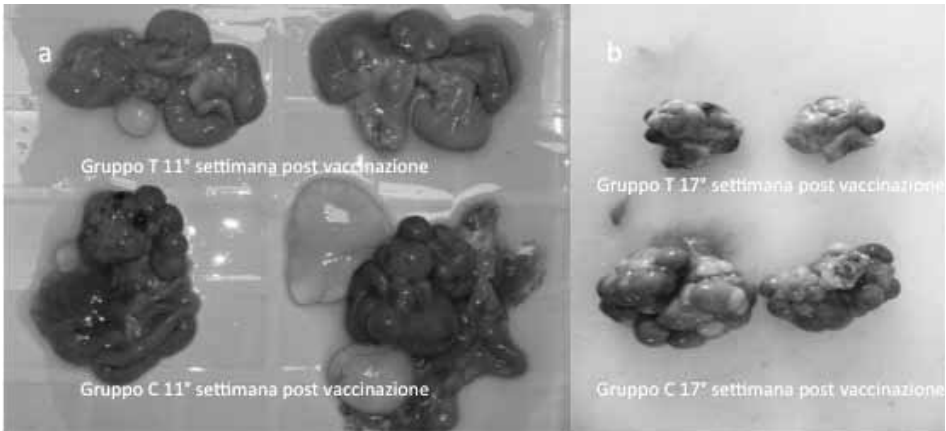


Figura 1. Comparazione tra ovaia provenienti da soggetti vaccinati (T) e non vaccinati (C) a 11 settimane (a) e a 17 settimane (b) dal termine del protocollo.

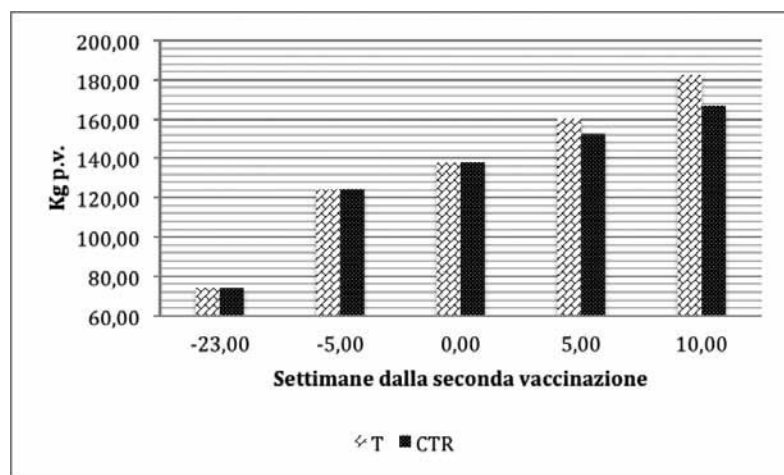
Figure 1. Comparison among ovaries coming from vaccinated (T) and non vaccinated (C) sows at 11 weeks (a) and 17 weeks (b) after the end of the protocol.



La comparazione in termini di peso ha evidenziato una differenza tra i due gruppi di particolare interesse arrivando al termine del monitoraggio ad una differenza di 228 grammi di incremento ponderale giornaliero a partire dal momento della seconda somministrazione di vaccino (grafico 2).

Grafico 2. Stima della variazione del peso corporeo durante il monitoraggio dei gruppi vaccinati (T) e controllo (CTR).

Graphic 2. Estimate of body weight variation during the monitoring period and up to 10 weeks after the 2nd dose of vaccine.



DISCUSSIONE

Nel presente monitoraggio, la somministrazione del vaccino antiGnRH nelle scrofe puberi ha determinato il blocco dell'attività ovarica considerando l'assenza di un livello circolante apprezzabile di P4 già a 35 giorni dopo la fine del protocollo vaccinale. I livelli di estrogeni non sono risultati differenti nel periodo di monitoraggio (35 giorni post vaccinazione) e rientrano nel livello riscontrabile nel normale ciclo ovarico evidenziando però un'alta variabilità. I livelli di P4 circolanti hanno invece mostrato la totale assenza di livelli determinabili nelle scrofe vaccinate e la normale variabilità nei soggetti non vaccinati. Alla decima settimana dopo vaccinazione il peso vivo medio del gruppo vaccinato mostrava una differenza di peso pari al 4,15 % superiore al gruppo non vaccinato. L'azione del vaccino si può evidenziare già nei primi cicli estrali dopo la seconda vaccinazione (assenza di P4 al 35° giorno post protocollo vaccinale) nella totalità dei soggetti (8/8). L'ipoplasia ovarica chiaramente riscontrata nelle scrofe a partire dalla 11° settimana e fino alla 17° indica il perdurare della mancanza di funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonadico. La condizione di ipoplasia evidenziata macroscopicamente può essere imputabile alla risposta immunitaria nei confronti del GnRH endogeno. L'aumento del peso medio finale, riscontrato nei maschi attribuibile alla ottimizzazione dell'utilizzo dell'alimento può essere evidenziato anche nelle scrofe macellate ad un peso superiore ai 175 Kg.

CONCLUSIONI

L'uso del vaccino nelle scrofe puberi ha determinato un'assenza di funzionalità ovarica dimostrata dall'assenza di livelli circolanti di P4 al 35° giorno post-protocollo vaccinale e l'evidenza macroscopica di una ipoplasia ovarica a partire dall'11° settimana e fino alla 17° settimana. L'incremento ponderale superiore risulta essere interessante anche se deve essere confermato con dati riguardanti l'indice di conversione.

BIBLIOGRAFIA

Font-i-Furnols M., Gispert M., Soler J., Diaz M., Garcia-Regueiro J.A., Diaz I., Pearce M.C. (2012). "Effect of vaccination against gonadotrophin-releasing factor on growth performance, carcass, meat and fat quality of male Duroc pigs for dry-cured ham production." *Meat Sci.* 91, 148-154.

Muya E.F. (2011) "Resultados del uso de la vacunacion como alternativa a la castacion fisica en ibericos". *Solo Cerdo Iberico*. 26, 1-3.

Tonon F., Gherpelli M. (2009) "L'ovarioisterectomia in campo nella scrofa". *Atti XXV Meeting annuale SIPAS*. Brescia 2009, 181-185.

CATETERIZZAZIONE NON INVASIVA PER PRELIEVI FREQUENTI NEL SUINO

A NON INVASIVE LONG TERM VENOUS CATHETERIZATION IN SWINE

VELOCI M.¹, MAZZONI C.¹, CINTI E.², BORRI E.¹, SCOLLO A.¹,
DE RENSIS F.³

¹ SUIVET, Reggio Emilia, Italia; ²Studio C.E s.r.l. (Piacenza, Italy);

³Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, Italia;

Parole chiave: vena auricolare, prelievi frequenti, suino.

Key words: ear vein, frequent sampling, swine.

Riassunto

In questo lavoro è stata descritta una tecnica di cateterizzazione auricolare permanente che permette di effettuare dei prelievi ematici frequenti nella specie suina per diversi giorni senza richiedere un intervento chirurgico e anestetico, ma solo il contenimento dell'animale. Come sede sono state scelte le vene auricolari. E' stato utilizzato un catetere di Polyetilene Tubing (I.D 0.76 mm (0.030" pollici) O.D. 1.22 (0.048")) (n°=10 scrofe). Il catetere è stato inserito nella vena auricolare mediale o laterale fino alla vena cava in prossimità del cuore mediante la tecnica "through the needle". I prelievi sono stati eseguiti ogni 15 min. dalle ore 9.00 alle ore 15.00 per 10 giorni consecutivi o fino a quando il catetere è rimasto funzionale.

Il tempo medio richiesto per la cateterizzazione con il Polyetilene Tubing è stato di 16-17 min. ed è stato possibile eseguire i prelievi per 8-9 giorni consecutivi.

I risultati indicano che il catetere inserito nella vena auricolare può rimanere *in situ* per diversi giorni permettendo così di effettuare dei prelievi frequenti con uno stress minimo per l'animale.

Summary

Several techniques for the collection of swine blood samples are currently in use but most of them involve surgical procedures under general anaesthesia. Several techniques for ear vein catheterization have been developed but they have been tested only for few days.

The aim of this study was to test a non-invasive venous catheterization in swine that allows frequent sampling for several days without any invasive intervention and with minimum disturbance to the animal.

For this study 10 pluriparous sows have been used. The technique involved the implantation of a catheter, with a "through the needle" technique, *via* the lateral or medial ear vein. The adopted catheters was a Polyetilene Tubing I.D 0.76 mm (0.030" inch) O.D. 1.22 (0.048") 90-120 cm, (n°=10 sows). Frequent blood samplings have been performed every 15 minutes for 6h consecutively from 9 a.m. to 3 p.m. for 10 days consecutively or until the catheter was functional.

The results of the study show that the ear vein catheterization with Polyetilene Tubing has been performed in 16-17 minutes and remained patent for 8-9 days. During the trial the pig behaved normally, presented a good appetite and normal body temperature.

INTRODUZIONE

Nel contesto della indagine clinica nella moderna azienda suinicola non è infrequente confrontarsi con protocolli di lavoro che richiedono dei prelievi ematici frequenti, cosa di non semplice attuazione data la non facile reperibilità di vene adatte per un simile scopo nella specie suina. Inoltre va sempre tenuto ben presente che il prelievo dovrebbe essere eseguito in condizioni di stress il più ridotte possibili onde evitare l'alterazione degli eventuali parametri ematici che si devono analizzare e quindi compromettere la validità dell'analisi.

Nel suino per eseguire prelievi singoli si possono utilizzare le vene auricolari, perché facilmente evidenziabili soprattutto negli animali con la cute di colore chiaro. Purtroppo questi vasi sono relativamente piccoli, permettono solo una raccolta di piccole quantità di sangue per ogni prelievo e necessitano di tempo prima di poter fare un secondo prelievo (Horlein et al., 1951). Altri punti utilizzabili sono la vena cava anteriore (Jackson et al., 1972) e il seno orbitale (Jackson et al., 1972; Huhn et al., 1969). Infine è possibile, anche se di non facile esecuzione, fare dei prelievi singoli dalla coda (Getty et al., 1967) e dalla vena addominale sottocutanea e cefalica (Staub, 1954).

Per quanto riguarda la possibilità di eseguire dei prelievi frequenti nel suino, i vasi nei quali è stato applicato un catetere permanente sono stati la vena giugulare (Christison et al., 1969; Donald et al., 1968; Hand et al., 1981; Knippel et al., 1975; Luke et al., 1978; Harris, 1974; Stukelj et al., 2005), la vena femorale o la vena safena (Huhn et al., 1969; Dougherty et al., 1965; Weirich et al., 1970), la vena coccigea mediana e la vena mammaria sottocutanea (Witzel et al., 1973). Purtroppo queste cateterizzazioni non sono semplici da eseguire, richiedono un intervento invasivo con la necessità di somministrare dei tranquillanti e/o degli anestetici e quindi poco applicabili in azienda. Altra sede in cui è stata descritta l'immissione di un catetere permanente è rappresentata dalle vene auricolari mediale e laterale (Grun et al., 1973; Zanella et al., 1992; Niiyama et al., 1985). Tuttavia nei precedenti studi il catetere è stato lasciato *in situ* solo per alcune ore e non esistono dati bibliografici che valutano la permanenza del catetere nella vena auricolare per diversi giorni.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di descrivere una tecnica di cateterizzazione nella specie suina che provochi il minimo stress all'animale, che non richieda nessun intervento chirurgico e anestetico, ma solo un breve contenimento, e che permetta di eseguire dei prelievi ematici frequenti in maniera continua per diversi giorni. Il punto di prelievo utilizzato sono state le vene auricolari. Sono stati inoltre messi a confronto due tipi di catetere al fine di individuare quello più appropriato.

MATERIALI E METODI

Animali e contenimento

Per questo studio sono state utilizzate 10 scrofe pluripare Large White x Landrace di peso medio di 225 Kg. La cateterizzazione è stata eseguita 24 ore dopo lo svezzamento (la lattazione è durata 21 giorni). Il contenimento dell'animale, senza alcuna somministrazione di tranquillanti o anestetici, perché non necessari, è stato eseguito applicando un torcinaso e mantenendo l'animale in posizione eretta.

Al fine di valutare il funzionamento nel tempo del catetere, i prelievi sono stati eseguiti con la frequenza di 15 min. dalle ore 9.00 alle ore 15.00 per 10 giorni consecutivi. La temperatura corporea è stata determinata due volte al giorno durante tutta la prova e per due giorni dopo la fine della prova.

Tipi di materiale utilizzato

Il tipo di catetere utilizzato è stato il Polyethylene Tubing (BD Intramedic™ Polyethylene Tubing Becton, Dickinson and Company® - I.D 0.76 mm (0.030" pollici) O.D. 1.22 (0.048") di 90-120 cm, (n°=10 scrofe).

Un ago ipodermico per bovino (14 G) è stato utilizzato come guida per l'inserimento del catetere mediante tecnica "through the needle" (Fig 1).

Fig. 1. Inserimento del catetere mediante guida (ago ipodermico per bovino da 14G)



Metodica di cateterizzazione

Dopo un opportuno lavaggio, i padiglioni auricolari sono stati disinfettati mediante una soluzione di etanolo al 70%. Per evitare contaminazioni durante l'inserimento, il catetere è stato contenuto in "camicie sanitarie" sterili.

Per la cateterizzazione sono state utilizzate la vena auricolare laterale o mediale scegliendo di volta in volta quella che si presentava con diametro maggiore, più evidenziabile e con la minore curvatura alla base dell'orecchio. Infatti, curvature troppo serrate della vena alla base dell'orecchio rendono più difficoltoso il passaggio della cannula e aumentano i rischi di rottura della vena (esperienza personale).

La guida è stata inserita nella vena (Fig. 1), partendo da una distanza di circa 5-7 cm dal margine esterno dell'orecchio, dopodiché il catetere è stato inserito tramite questa all'interno del vaso. Il catetere, opportunamente contrassegnato ogni 5 cm, è stato fatto scorrere nella vena auricolare attraversando la vena auricolare laterale o mediale, la vena auricolare caudale, la vena mascellare, la giugulare esterna, la vena brachicefalica e infine la vena cava anteriore. Una volta inserito il catetere, la guida è stata rimossa. Solitamente la parte del catetere posta all'interno dei vasi è stata di circa 20-25 cm.

Per connettere al catetere la siringa utilizzata per eseguire il prelievo, nella parte finale del catetere è stato applicato un adattatore ottenuto utilizzando un ago ipodermico da bovino da 14G (2.0 x 40 mm) con la punta preventivamente smussata e chiuso con un tappo di tipo Luer Lock (Sanitalia care).

Fissaggio del catetere

Per evitare contaminazioni durante l'inserimento, il catetere è stato contenuto in "camicie sanitarie" sterili. Per proteggere il catetere da eventuali schiacciamenti e compressioni, la parte del catetere esterna alla vena è stata protetta da un tubo di silicone di circa 50-60 cm (20 cm per raggiungere la base dell'orecchio, più 15 cm per raggiungere la base del collo, più 15 cm da avvolgere dentro il sacchetto) opportunamente sterilizzato. Onde evitare che i movimenti del collo e della testa potessero estroflettere il catetere, quest'ultimo è stato arrotolato ed alloggiato in un sacchettino di plastica posto a 4-6 cm dall'attaccatura delle orecchie alla testa, cercando di minimizzare la lunghezza del catetere "libero" tra la base dell'orecchio e l'alloggiamento.

Il catetere è stato fissato tra le spalle della scrofa mediante l'utilizzo di una benda adesiva (bendaggio elastico con autofissante in t.n.t di 10 cm di altezza) (Fig. 2). In alcuni animali (n°=5 per gruppo) il catetere e il sacchetto di contenimento sono stati ulteriormente fissati con alcuni punti chirurgici, avvalendosi dell'ausilio di un foglietto di silicone come impalcatura.

Fig. 2. Bendaggio di contenimento del catetere e della prolunga.



Prelievi ematici e mantenimento della pervietà del catetere

I prelievi ematici sono stati ottenuti raccordando normali siringhe da 5 ml all'adattatore posto nella parte terminale del catetere. I prelievi sono stati eseguiti ogni 15 min. dalle ore 9.00 alle ore 15.00 o fino a quando il catetere è rimasto funzionale o fino a un massimo di 10 giorni consecutivi. Dopo ciascun prelievo, al fine di evitare la formazione di coaguli e trombi, sono stati iniettati 2 ml di soluzione fisiologica contenente eparina (50 U.I./ml). Infine, per mantenere il catetere pervio anche nei periodi durante i quali il catetere non è stato utilizzato per i prelievi frequenti, ogni 6 ore è stato effettuato un lavaggio con 5ml ml di soluzione eparinizzata. la soluzione fisiologica e l'eparina sono stati sostituiti ogni 6 ore.

Durante la prova agli animali è stato eseguito un trattamento profilattico con antibiotici.

Analisi statistica dei dati

I dati riguardanti i tempi per l'inserzione dei cateteri e il periodo di funzionalità dei cateteri sono risultati normalmente distribuiti (Martinez-Iglewicz test) ed omoschedastici (Modified-Levene Test) e di conseguenza sono stati analizzati mediante lo Student's t test e la significatività posta per $P < 0.05$.

Risultati

Inizialmente in tre animali rotture della vena auricolare e conseguenti piccoli ematomi si sono verificati quando la curvatura della vena alla base dell'orecchio era troppo accentuata (quasi ad angolo retto). Quando questo si è verificato gli animali non sono stati inclusi nello studio.

L'ago guida (14 G) è risultato utile per inserire il catetere nella vena auricolare.

Il tempo di effettuazione dell'intervento di 16-17 min. e il catetere è rimasto funzionale per 8-9 giorni (Tab. 1).

N° scrofe	Tipo di catetere	Vena auricolare utilizzata	Tempo per la cateterizzazione (min.)	Persistenza del catetere (giorni)
10	Polyetilene Tubing	laterale (n=4)	17±4.0 ^a	8±0.9 ^a
		mediale (n=6)	16±3.2 ^a	9±1.0 ^a

Tab.1 Tempi per eseguire la cateterizzazione della vena auricolare nel suino (media±DS) e permanenza del catetere (media±DS). ^{a,b} Valori nella stessa colonna con lettere diverse sono significativamente differenti ($P < 0.05$).

DISCUSSIONE

Il tempo necessario per l'immissione del catetere è stato di pochi minuti confermando i precedenti dati di Niiyahana et al. (1985). I dati del nostro lavoro implementano quelli di Niiyahana et al. (1985) e dimostrano che questa tecnica permette di eseguire prelievi frequenti anche per diversi giorni senza che ci siano problematiche di rilievo né per l'animale né per eseguire i prelievi.

Durante l'immissione del catetere, il punto di maggiore criticità è stato a livello della curvatura alla base dell'orecchio, che però è stato superato applicando piccoli movimenti in avanti e indietro fino a superare l'ostacolo. Altre resistenze, oltre il punto menzionato, si sono verificate solo in prossimità del cuore e quando questo si è verificato, il catetere è stato opportunamente retrocesso per alcuni centimetri.

L'applicazione di punti chirurgici per fissare il catetere è stata più efficace rispetto al solo bendaggio poiché questa tecnica non sempre ha impedito l'occlusione o il piegamento del catetere nel punto di uscita dal vaso. Inoltre è importante che il bendaggio copra l'orecchio partendo dalla curva del catetere fino alla base dell'orecchio, lasciando scoperto il meno possibile il catetere stesso. La benda elastica autofissante ha consentito la massima libertà di movimento per l'animale, non ha recato alcun fastidio rilevabile ed ha evitato che l'animale provasse a rimuovere il bendaggio.

Nessun animale ha presentato problematiche sanitarie rilevabili né nei giorni dei prelievi, né nella settimana successiva alla rimozione del catetere, la temperatura corporea si è mantenuta nella norma.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio indicano che la cateterizzazione non chirurgica della vena auricolare nella scrofa permette di eseguire dei prelievi ematici frequenti per diversi giorni senza sottoporre l'animale ad alcuno stress, se non quello, minimo, del contenimento al momento dell'impianto del catetere. Dato che questo tipo di cateterizzazione non richiede l'utilizzo di alcun tipo di sedativo o anestetico, può essere utilizzato in azienda senza particolari accorgimenti.

BIBLIOGRAFIA

- Christison G.I., Curtin T.M. (1969) "A simple venous catheter for a sequential blood sampling from unrestrained pigs". *Lab Anim Care*. 19:259-262.
- Donald R.A., Salisbury M.S., Nabarpo JDN (1968) "The plasma corticotrophin response to insulin hypoglycemia, lysine-vasopressin and metyrapon in pigs". *J Endocr.* 41, 509-518.
- Dougherty R.W., Shuman R.D., Mullenax C.H., Witzel D.A., Buck W.B., Wood R.L., Cook H.M. (1965) "Physiopathological studies of erysipelas in pigs". *Cornell Vet.* 55,87-109.
- Getty R., Choshal N.G. (1967) "Applied anatomy of the sacrococcygeal region of pig as related to tail-bleeding". *Vet Med Small Animal Clin.* 63 ,361-367.
- Grun E., Huller H.G., Mockel H.G. (1973) "Dauckatheter am schweinohr". *Monats Veterinaarmed*, 28, 263-265.
- Hand M.S., Philips R.W., Miller C.W., Mason R.A., Lumb W.V. (1981) "A method for quantitation of hepatic, pancreatic, and intestinal function in conscious Yucatan Miniature Swine". *Lab Anim Sci.* 31, 728-731.
- Harris W.H. (1974) "A technique for chronic venous cannulation in swine". *Laboratory Animals*. 8, 237-240.
- Horlein A.B., Hubbard A.B., Getty R. (1951) "The procurement and handling of swine blood samples on the farm". *J Am Vet Med Ass*, 119 ,357-362.
- Huhn R.G., Osweiler G.D., Switzer W.P. (1969) "Application of the orbital sinus bleeding technique to swine". *Lab Anim Care* 19:403-405.
- Knippel J.E., Peace R.W., Evans J.A. (1975) "Multiple vascular and gastric cannulation of swine for studies of gastrointestinal, liver, and peripheral tissue metabolism". *Lab Anim Sci.* 25, 74-78
- Jackson I.M., Cook D.B., Cill G. (1972) "Simultaneous intravenous infusion and arterial blood sampling in piglets". *Lab Anim Sci.* 22 ,552-555.
- Luke J.N., Hall G.M. (1978) "A technique for measuring hepatic blood flow and oxygen consumption in the anesthetised pig". *Res Vet Sci.* 25, 393-394.
- Niiyama, M., Yonemichi, H., Haharada, E., Syuto, B., Kitagawa, H. (1985) "A simple catheterization from the ear vein into the jugular vein for sequential blood sampling from unrestrained pigs". *Jpn J Vet Res.* 33,1-9.
- Staub, H. (1954) "Ein Beitrag zur Blutentnahme bei Ferkeln". *Berl Münch Tierärztl Wsch*, 67: 188-189.
- Stukelj M., Mihelcic D., Butinar J., Nemec A., Pecar J. (2005). "Surgical intravenous catheterization of Pig". *Slov Vet Res.* 43, 43-48.
- Weirich, W.E., Will, J.A., Crumpton, C.W. (1970) "A technique for placing chronic indwelling catheters in swine". *J Appl Physiol.* 28, 117-119.
- Witzel D.A., Littledike E.T., Cook H.M. (1973) "Implanted catheters for blood sampling in swine". *Cornell Vet.* 63, 433-435.
- Zanella, A.J., Mendl, M.T. (1992) "A fast and simple technique for jugular catheterization in adult sows". *Laboratory Animals* 26, 211-213.

PREMIO GUADAGNINI 2015

EFFETTI DI FOTOPERIODI DI DIVERSA DURATA SU PARAMETRI PRODUTTIVI, COMPORTAMENTO, QUALITÀ DI CARNI E PROSCIUTTI DI SUINI PESANTI ITALIANI

GROWTH PARAMETERS, BEHAVIOUR, MEAT AND HAM QUALITY OF HEAVY PIGS SUBJECTED TO PHOTOPERIODS OF DIFFERENT DURATION

MARTELLI G., NANNONI E., GRANDI M., BONALDO A., ZAGHINI G.,
VITALI M., BIAGI G., SARDI L.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna

Parole Chiave: benessere animale, qualità dei prosciutti, suino pesante, fotoperiodo, qualità della carne

Key Words: animal welfare, ham quality, heavy pig, light duration, meat quality

Riassunto

La presente prova ha coinvolto 40 suini, maschi castrati, ibridi commerciali destinati alla produzione del Prosciutto di Parma. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi omogenei di 20 suini ciascuno e allevati fino al peso medio di macellazione di 160kg. Per tutto il ciclo produttivo, il gruppo di controllo (C) ha ricevuto il fotoperiodo minimo richiesto dalla normativa comunitaria (8 ore di luce al giorno), mentre il gruppo L ha ricevuto 16 ore di luce al giorno. I suini L hanno mostrato un maggiore peso vivo e peso della carcassa rispetto ai C ($P=0.005$ e 0.007 , rispettivamente). Inoltre, le cosce ottenute dal gruppo L erano significativamente più pesanti e il loro calo di peso durante la stagionatura era ridotto ($P<0.01$) rispetto al gruppo C. Nessuna differenza significativa è stata rilevata per quanto riguarda la qualità delle carni e dei prosciutti. I suini L hanno passato una porzione maggiore della fotofase stesi in posizione di riposo e hanno ridotto la sovra-esplorazione del box ($P<0.01$). I nostri risultati indicano che, garantendo un adeguato periodo di buio per il riposo degli animali, il prolungamento del fotoperiodo può avere effetti benefici sui parametri produttivi senza influire negativamente sul comportamento animale, sulle caratteristiche della carcassa o sulla qualità delle carni e dei prosciutti. Pertanto allevare suini in condizioni di semi-oscurità è da considerarsi una pratica priva di fondamento e contraria al benessere animale.

Abstract

Forty crossbred (Large White $\times$ Landrace) castrated males pigs (initial average BW: 26 kg) intended for Parma Ham production were used in this trial. Animals were raised up to the weight of 160kg. Pigs were homogeneously allotted to two experimental groups, each comprising 20 pigs. During the whole production cycle, the Control group (C) received the minimum mandatory number of hours of light per day (8 hours), whereas the Long photoperiod group (L) was subjected to 16 hours of light per day. Pigs in the L group showed a greater live weight and carcass weight if compared to C group ($P=0.005$ and 0.007 , respectively). Similarly, hams obtained from the L group were significantly heavier and their weight losses during the dry-curing period was reduced ($P<0.01$) when compared to the C group. No significant differences were detected between the groups as concerns meat and ham quality. Pigs in the L group spent a greater portion of the photophase resting and less time pseudo-rooting ($P<0.01$). Our results indicate that, given an appropriate dark period for animal rest, an increased duration of the

photoperiod can favourably affect growth parameters of heavy pigs without any negative effect on animal behaviour, carcass traits, meat or long-cured ham quality. Therefore rearing pigs in semi-darkness should be considered as a baseless practice, contrary to animal welfare. [The original full paper is published in *Journal of Animal Science*]

INTRODUZIONE

Al fine di garantire un adeguato livello di benessere animale, e di contrastare l'eventualità che i suini vengano allevati in condizioni di semi-oscurità, la legislazione comunitaria (EC, 2008) stabilisce un livello minimo di illuminazione ambientale: un'intensità di almeno 40 lux per un periodo minimo di 8 ore al giorno. Questa misura riflette l'esistenza di un fabbisogno da parte dei suini in termini sia di intensità che di durata della luce, fabbisogno che deve essere soddisfatto al fine di permettere le attività esplorative e le interazioni sociali, e quindi favorire il raggiungimento di adeguati standard di benessere animale (EFSA, 2007). Se gli effetti di diversi regimi di illuminazione sul benessere e sul comportamento dei suini sono già stati indagati (Van Putten e Elshof, 1984; Baldwin e Start, 1985; Taylor et al., 2006), lo stesso non si può dire per gli effetti della luce sui parametri produttivi e sulla qualità di carni e prodotti derivati.

Secondo le nostre ricerche bibliografiche, gli unici studi sul legame tra il fotoperiodo e la qualità delle carni sono stati condotti da Virgili e Schivazappa (2002) e Virgili et al. (2002), che hanno individuato variazioni circannuali dell'attività della catepsina B nei prosciutti, loro volta legate allo sviluppo di eccessiva tenerezza e difetti sensoriali nei prosciutti durante la stagionatura (Parolari et al., 1994; Virgili et al., 1998).

Precedenti studi condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno evidenziato che il prolungamento della fotofase (14 vs. 8 ore di luce al giorno) può avere effetti positivi sugli accrescimenti e sui tratti comportamentali (Martelli et al., 2005), e che un aumento dell'intensità luminosa (80 vs. 40 lux) riduce i comportamenti aggressivi nei suini pesanti (Martelli et al., 2010). Inoltre, né l'aumento dell'intensità (80 vs. 40 lux) né della durata della fotofase (14 vs. 8 ore) ha effetti negativi su parametri produttivi o sulla qualità delle carni e dei prosciutti (Sardi et al., 2012). Lo scopo della presente prova è stato quello di investigare gli effetti di un ulteriore aumento nella durata delle fotofase (16 vs. 8 ore), applicata all'intensità luminosa minima di legge (40 lux), su comportamento, parametri produttivi, qualità di carcasse, cosce fresche e prosciutti stagionati.

MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta presso gli stabulari del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna, in osservanza della normativa vigente (Direttiva EC 2008/120) sulla protezione dei suini. Il comitato etico dell'istituzione ha approvato il protocollo sperimentale.

Animali, allevamento e alimentazione

La prova ha coinvolto 40 suini, ibridi commerciali (Large White × Landrace) maschi castrati. Il peso vivo (PV) medio all'inizio della prova era di (26 ± 2.65) kg. Gli animali sono stati allevati fino al raggiungimento di un PV di circa 160 kg ad un'età di almeno 9 mesi, in accordo con le regole dettate dal Disciplinare produttivo del Prosciutto di Parma (Consorzio del Prosciutto di Parma, 1992).

I suini sono stati allevati in box collettivi (5 capi/box) su pavimento grigliato, con uno spazio pro capite di 1.20 m², in sale dotate di controllo del microclima. Ogni box era dotato di abbeveratoio a succhiotto, mangiatoia collettiva a truogolo e arricchimento ambientale (catena metallica appesa). L'alimento veniva fornito due volte al giorno sotto forma di broda (rapporto acqua:sfarinato = 3:1), razionata sulla base del peso vivo metabolico fino ad un massimo di 2.8 kg S.S. per capo al giorno. L'illuminazione, interamente artificiale, era fornita tramite tubi al neon. L'intensità luminosa, misurata all'altezza dell'occhio degli animali con un luxmetro, era

di 40 lux durante la fotofase e di 1.5 lux durante la scotofase in tutti i box. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali, sottoposti ai seguenti regimi luminosi:

- Gruppo di controllo (C): i suini ricevevano 8 ore di luce al giorno, dalle 08:00 alle 16:00, seguite da 16 ore di buio;
- Gruppo a fotoperiodo prolungato (L): i suini ricevevano 16 ore di luce al giorno, dalle 06:00 alle 22:00, seguite da 8 ore di buio.

Parametri produttivi

Gli animali sono stati pesati individualmente all'inizio, circa a metà (d 155) e al termine della prova (d 251) per calcolare gli incrementi ponderali giornalieri (IPG). I consumi alimentari di tutti i box sono stati registrati giornalmente per calcolare gli indici di conversione alimentare (ICA). I parametri di accrescimento sono stati raccolti fino al 251° giorno, quando metà degli animali hanno raggiunto il peso di 160 kg e sono stati macellati. Gli altri suini sono rimasti nelle condizioni sperimentali fino al raggiungimento dello stesso peso, quando sono stati a loro volta macellati.

Tratti comportamentali

Fra 100 e 160 kg PV, il comportamento dei suini è stato videoregistrato durante le ore di luce (8 ore nel gruppo C, 16 ore nel gruppo L) grazie a telecamere a circuito chiuso montate al di sopra dei box. Le videoriprese sono state eseguite con cadenza mensile (4 sessioni per ogni box). I video sono poi stati esaminati da un operatore addestrato e i comportamenti sono stati valutati utilizzando la tecnica dello scan sampling a intervalli di 10 minuti, secondo un etogramma predefinito (Martelli et al., 2014).

Qualità della carcassa, della carne e delle cosce fresche

Alla macellazione sono stati raccolti i seguenti dati: peso della carcassa (PC), resa a caldo, percentuale di tagli magri (misurata tramite Fat-o-Meater – F-o-M) e peso dei principali tagli commerciali. A 45 min. *post mortem*, è stato misurato il pH del muscolo *Semimembranosus* (SM) utilizzando un pH-metro portatile. A 24 ore dalla macellazione, la misura del pH nel muscolo SM è stata ripetuta e il colore del muscolo *Biceps femoris* (BF) è stato valutato con l'ausilio di un colorimetro portatile (Minolta CR-200). Lo spessore del grasso sottocutaneo è stato misurato verticalmente sulla parte esterna della coscia fresca in corrispondenza della testa del femore ("sottonoce"), secondo le indicazioni del Disciplinare del Prosciutto di Parma.

Il calo di gocciolamento (drip loss) e il calo di cottura (cooking loss) della carne fresca sono stati misurati in campioni prelevati dal muscolo *Longissimus dorsi* (LD) in accordo al metodo descritto da Honikel (1998).

Campioni di grasso sottocutaneo sono stati prelevati dal grasso di copertura delle cosce di 14 suini per ogni gruppo sperimentale, al fine di determinarne la composizione acidica mediante gascromatografia. I lipidi totali sono stati estratti da ogni campione con il metodo di Folch (1957) e pesati. Successivamente, gli acidi grassi sono stati esterificati e inviati all'analisi gascromatografica. I risultati sono espressi in percentuale degli acidi grassi totali. Il numero di iodio è stato determinato secondo il metodo AOAC (2006).

Cali di stagionatura e qualità dei prosciutti

Tutte le cosce fresche sono state inviate alla stagionatura, che è stata condotta secondo le indicazioni del Disciplinare per un periodo di 18 mesi. Le cosce sono state pesate prima e dopo la rifilatura, al termine della salagione e a fine stagionatura per calcolare i cali di peso per ognuna delle fasi produttive. Dalle cosce stagionate sono stati prelevati 28 campioni di BF (14 per gruppo sperimentale), sui quali sono stati determinati analiticamente l'umidità, le proteine

gregge, il contenuto in sodio cloruro (AOAC, 2006) e l'indice di proteolisi (Careri et al., 1993). Il colore dei prosciutti è stato misurato a livello del muscolo SM e del grasso stagionato. Campioni di grasso sottocutaneo stagionato sono stati prelevati e la composizione acidica è stata determinata mediante gascromatografia. Sul grasso sottocutaneo sono stati determinati il valore di perossidi (AOAC, 2006) e i TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substances, espresse come mg di malondialdeide(MDA)/kg secondo il metodo proposto da Wang et al., 2002).

Infine, i prosciutti stagionati sono stati valutati visivamente da un panel di cinque esperti, che hanno espresso una valutazione sensoriale soggettiva secondo una checklist predeterminata, esprimendo un valore su di una scala da 1 a 10 (dove 1 corrispondeva all'assenza del tratto considerato, e 10 alla sua massima espressione) per ognuna delle seguenti caratteristiche: consistenza, omogeneità del colore e bitonalità della parte magra; marezzatura, adiposità del prosciutto, consistenza del grasso. La scheda prevedeva anche l'espressione di una valutazione complessiva sui prosciutti (da 1 = pessima qualità, a 10 = ottima qualità) (Mordenti et al., 2012).

Analisi Statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando la durata del fotoperiodo come effetto principale. Il box (5 suini) è stato usato come unità sperimentale per ICA e osservazioni comportamentali, mentre i dati individuali sono stati utilizzati come unità sperimentale per IPG, parametri di macellazione, qualità delle carni e dei prosciutti. I dati nonparametrici (comportamento e valutazione sensoriale) sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney. Il livello di significatività è stato fissato a $P < 0.05$ per tutti i test.

RISULTATI

I parametri di accrescimento sono riportati in tabella 1. Gli animali del gruppo L hanno raggiunto un PV significativamente più elevato rispetto al gruppo C sia a metà ($P = 0.007$) che al termine della prova ($P = 0.044$). Anche l'IPG del gruppo L è stato maggiore rispetto al gruppo C, sia durante la prima fase ($P = 0.010$) sia nel complesso della prova ($P = 0.048$). Di conseguenza, gli ICA sono risultati più favorevoli nel gruppo L, con differenze significative ($P = 0.044$) durante il primo periodo.

Tabella 1: Parametri produttivi di suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi

Table 1: Productive parameters of heavy pigs subjected to different photoperiods

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Animali (box), n.	20(4)	20(4)	-
<i>Peso Vivo (PV), kg</i>			
PV iniziale	26.1	26.3	0.45
PV intermedio (155d)	96.3 ^B	106.4 ^A	8.22
PV finale (251d)	155.4 ^b	166.8 ^a	15.77
<i>Incremento Ponderale Giornaliero (IPG), g/d</i>			
IPG 1-155d	452 ^B	518 ^A	13.3
IPG 156-251d	616	630	14.9
IPG 1-251d	515 ^b	561 ^a	11.8
<i>Indice di Conversione Alimentare (ICA)</i>			
ICA 1-155d	3.82 ^a	3.36 ^b	0.16
ICA 155-251d	4.18	4.02	0.14
ICA 1-251d	3.97	3.63	0.13

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{A,B} $P < 0.01$; ^{a,b} $P < 0.05$)

Means within a row with different superscripts differ (^{A,B} $P < 0.01$; ^{a,b} $P < 0.05$)

I parametri di macellazione e le caratteristiche delle carcasse sono illustrati in tabella 2. I suini del gruppo L hanno mostrato un maggiore peso vivo alla macellazione, e di conseguenza un maggiore peso della carcassa, rispetto al gruppo C ($P=0.005$ e 0.007 , rispettivamente). Nessuna differenza significativa è stata rilevata nell'adiposità della carcassa o nelle rese in tagli magri.

Tabella 2: Parametri di macellazione e qualità delle carcasse di suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi

Table 2: *Slaughtering parameters and carcass traits of heavy pigs subjected to different photoperiods*

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Animali, n.	20	20	-
Peso Vivo, kg	162.8 ^B	175.0 ^A	2.27
Peso Carcassa a Freddo (PC), kg	132.1 ^B	142.5 ^A	2.00
Resa di macellazione, %	81.4	81.1	0.28
F-o-M F (spessore LD), mm	59.8	63.7	
F-o-M SR (spessore lardo dorsale), mm	22.7	27.0	
Carne magra (F-o-M), %	50.15	50.16	0.55
Lombo, %PC	23.53	23.24	0.17
Cosce, %PC	23.82	24.05	0.17
Tagli magri, %PC	60.8	60.7	0.32
Tagli grassi, %PC	31.7	31.7	0.33
Tagli magri/Tagli grassi	1.92	1.91	0.04

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{A,B} $P < 0.01$)
Means within a row with different superscripts differ (^{A,B} $P < 0.01$)

La tabella 3 riassume i parametri rilevati sulle cosce fresche. Per quanto riguarda la porzione magra, pH e colore non hanno mostrato differenze significative. Anche la capacità di ritenzione idrica (drip loss e cooking loss) era simile fra i gruppi sperimentali (dati non riportati). Alcune differenze sono state invece rilevate a carico del grasso sottocutaneo delle cosce fresche: lo spessore del grasso sottocutaneo era significativamente più elevato nel gruppo L ($P=0.038$). Nessuna differenza significativa è stata evidenziata nel contenuto in singoli acidi grassi (dati non riportati), sebbene il gruppo L abbia mostrato rispetto al gruppo C un contenuto tendenzialmente più elevato di acido oleico (44.04 vs. 42.65%, $P=0.10$) e ridotto di acido linoleico (12.42 vs. 13.86%, $P=0.066$). Di conseguenza, il gruppo L ha fatto registrare un contenuto in PUFA significativamente inferiore ($P=0.047$), e un rapporto MUFA/PUFA tendenzialmente più elevato ($P=0.064$) rispetto al gruppo di controllo. Infine, sebbene la differenza fra i gruppi non fosse significativa, il numero di iodio è risultato più basso nel gruppo L.

Tabella 3: Qualità della cosce (porzione magra e grasso) di suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi

Table 3: *Quality of thighs (lean and fat portion) from heavy pigs subjected to different photoperiods*

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Animali, n.	20	20	-
<i>pH (SM)</i>			
pH 45 min.	6.16	6.20	0.04
pH 24 h	5.62	5.60	0.01
<i>Colore (BF)</i>			
L	50.72	50.54	0.40
Tinta	0.78	0.77	0.02
Croma	9.19	8.99	0.25
Campioni, n.	14	14	-
Spessore del grasso sottonoce, cm	2.47 ^b	2.89 ^a	0.42
<i>Composizione acidica del grasso sottocutaneo fresco</i>			
Saturi (SFA), %	37.52	37.45	0.25
Monoinsaturi (MUFA), %	45.46	47.13	0.62
Polinsaturi (PUFA), %	15.19 ^b	13.61 ^a	0.57
MUFA/PUFA	3.04	3.49	0.13
Numero di iodio	67.70	65.74	0.71

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{a,b} $P < 0.05$)

Means within a row with different superscripts differ (^{a,b} $P < 0.05$)

I pesi delle cosce e i cali di peso durante la stagionatura sono mostrati in tabella 4. Il peso iniziale delle cosce era significativamente più elevato nel gruppo L ($P=0.001$). Tale differenza è rimasta significativa durante tutte le fasi successive della stagionatura. Il calo di peso complessivo è risultato più contenuto nei prosciutti appartenenti al gruppo L rispetto al gruppo di controllo ($P=0.01$).

Per quanto riguarda i prosciutti stagionati (tabella 5), l'unica differenza significativa è stata rilevata nel contenuto in sodio cloruro, che è risultato più basso nei prosciutti del gruppo L ($P=0.033$). Anche se non statisticamente significativo, il grasso stagionato del gruppo L ha mostrato un andamento favorevole per quanto riguarda l'ossidazione lipidica, infatti i perossidi erano più bassi rispetto al gruppo C. Questa osservazione è in accordo col fatto che la perdita di PUFA durante la stagionatura è stata meno importante nel gruppo L rispetto al gruppo C (da 13.61 a 12.26% vs. da 15.19 a 11.71%, rispettivamente).

Tabella 4: Pesì e cali di peso durante la stagionatura delle cosce provenienti da suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi

Table 4: *Weights and weight losses of hams from heavy pigs subjected to different photoperiods*

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Cosce, n.	20	20	-
Peso pre-rifilatura, kg	16.26 ^B	17.95 ^A	0.28
Peso rifilato (PR), kg	13.33 ^B	14.51 ^A	0.18
Peso dopo salagione, kg	13.01 ^B	14.19 ^A	0.18
Peso finale (dopo 18 mesi), kg	9.16 ^B	10.39 ^A	0.18
Calo di rifilatura, %	17.85	19.09	0.46
Calo di salagione, %PR	2.35	2.24	0.18
Calo di peso totale, %PR	30.57 ^A	28.43 ^B	0.47

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{A,B} $P < 0.01$)
Means within a row with different superscripts differ (^{A,B} $P < 0.01$)

Tabella 5: Analisi chimica, stato ossidativo, composizione acidica e colore dei prosciutti stagionati provenienti da suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi

Table 5: *Chemical analysis, oxidation state, acidic composition and colour of cured hams from heavy pigs subjected to different photoperiods*

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Campioni, n.	14	14	-
<i>Qualità della carne</i>			
Umidità, %	60.64	61.01	0.41
Proteina Greggia, % (sul tal quale)	27.36	27.61	0.18
Sodio cloruro, % (sul tal quale)	6.89 ^a	6.32 ^b	0.24
Indice di proteolisi	25.06	26.56	0.47
<i>Ossidazione del grasso sottocutaneo</i>			
Perossidi	10.0	8.48	0.82
TBARS, MDA mg/kg ¹	1.39	1.32	0.13
<i>Composizione acidica del grasso sottocutaneo stagionato</i>			
Saturi (SFA), %	34.03	34.20	0.21
Monoinsaturi (MUFA), %	52.56	52.60	0.51
Polinsaturi (PUFA), %	11.71	12.26	0.49
<i>Colore del grasso sottocutaneo</i>			
L	70.32	71.35	0.27
Tinta	-1.38	-1.32	0.03
Croma	6.99	6.62	0.13
<i>Colore della porzione magra (muscolo Semimembranosus)</i>			
L	34.58	35.08	0.67
Tinta	0.36	0.31	0.02
Croma	8.37	8.80	0.47

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{a,b} $P < 0.05$)
Means within a row with different superscripts differ (^{a,b} $P < 0.05$)

L'analisi sensoriale dei prosciutti stagionati non ha mostrato alcuna differenza significativa fra i gruppi sperimentali (dati non riportati), sebbene i prosciutti provenienti dal gruppo L abbiano ottenuto un punteggio più elevato nella valutazione complessiva rispetto al gruppo C (7.25 vs. 6.63 punti).

Le osservazioni comportamentali (tabella 6) indicano che durante la fotofase prolungata a cui erano soggetti, gli animali del gruppo L hanno passato più tempo in decubito laterale rispetto al gruppo C ($P < 0.01$), hanno aumentato il tempo totale passato in decubito (laterale + sternale, $P < 0.001$) e mostrato una riduzione nel tempo passato ad esplorare il pavimento del box ($P < 0.001$).

Tabella 6: Osservazioni comportamentali di suini pesanti soggetti a diversi fotoperiodi. I dati sono espressi come percentuale sul totale dei comportamenti osservati.

Table 6: Behavioural patterns of heavy pigs subjected to different photoperiods. Data are expressed as percentage of total observed behaviours.

	Fotoperiodo		SEM
	C (8h di luce/die)	L (16h di luce/die)	
Replicazioni, n.	4	4	-
In piedi inattivi	0.06	0.13	0.04
Seduti inattivi	1.41	1.59	0.19
Decubito laterale	41.40 ^B	52.78 ^A	2.27
Decubito sternale	34.87	31.91	1.60
Totale decubito	76.26 ^B	84.68 ^A	1.35
Mangiano	9.13	6.62	0.75
Bevono	0.04	0.12	0.04
Camminano	0.02	0.02	0.01
Mordono le sbarre	0.08	0.15	0.07
Esplorano il pavimento	12.20 ^A	6.17 ^B	0.87
Altro	0.88	0.67	0.23

Lettere diverse sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (^{A,B} $P < 0.01$)
Means within a row with different superscripts differ (^{A,B} $P < 0.01$)

DISCUSSIONE

Poiché secondo la letteratura scientifica i suini non amano le intensità di illuminazione troppo elevate, e sembrano preferire l'oscurità per dormire (Baldwin & Start, 1985; Taylor et al., 2006), nella nostra prova le intensità luminose sono state volutamente mantenute a livelli bassi (40 lux, corrispondente al minimo di legge) e il fotoperiodo ha sempre concesso una fase di buio di almeno 8 ore per garantire agli animali la possibilità di riposare.

Il gruppo L ha mostrato migliori accrescimenti (peso finale e IPG complessivo) rispetto al gruppo C. Questa differenza è più evidente nella prima fase della prova, come confermato da IPG e ICA, che differiscono significativamente in questo periodo. I parametri produttivi nel complesso sono risultati in linea con le medie nazionali.

Nonostante il loro peso medio di macellazione più elevato, i suini del gruppo L non hanno mostrato un aumento nell'adiposità della carcassa. Questo risultato è in accordo con precedenti prove nelle quali l'aumento della durata della fotofase era meno pronunciato (Martelli et al., 2005; Sardi et al., 2012) ed indica come gli animali del gruppo L abbiano avuto un maggiore

sviluppo corporeo, che comunque non ha alterato la composizione della carcassa. Poichè gli animali ricevevano un'alimentazione razionata, tale differenza nei parametri produttivi (il 13% per l'IPG nel primo periodo) non è attribuibile a differenze di ingestione, bensì ad altri fenomeni metabolici. Nel nostro caso non si può escludere un aumento della secrezione di GH (Growth Hormone), anche se non è stata condotta alcuna analisi specifica. In letteratura è stato ipotizzato che un aumento delle ore di luce possa stimolare la secrezione di GH nei suini (Claus e Weiler, 1994), e un effetto simile è stato osservato nelle capre (Jin et al., 2012). Dubreuil et al. (1988) hanno dimostrato che l'oscurità riduce i valori basali di GH in suini di entrambi i sessi, e che negli agnelli la secrezione di GH è aumentata durante il riposo (Laurentie et al., 1989). Nel nostro caso, l'effetto congiunto di una fase di buio più breve e di un maggiore tempo dedicato al riposo durante le ore di luce potrebbe aver aumentato la secrezione del GH, e quindi favorito lo sviluppo corporeo complessivo, ipotesi che spiegherebbe il più elevato peso di macellazione a fronte di una identica composizione della carcassa (cioè il fatto che gli animali fossero di dimensioni maggiori, ma non più grassi). Inoltre, l'elevato livello di calma osservato fra i 100 e i 160 kg (il gruppo L ha dedicato una parte maggiore del periodo di luce al riposo) potrebbe aver ridotto la quantità di energia consumata (e sprecata) dagli animali nell'espressione di altri comportamenti, come la sovra-esplorazione del box (che in genere si osserva in condizioni di stress o frustrazione). Ciononostante, è bene evidenziare come, a fronte dei migliori parametri produttivi del gruppo L, le differenze in IPG e ICA fossero significative solo nella prima fase della prova, quando non sono state effettuate videoregistrazioni.

Per quanto riguarda il comportamento degli animali, le nostre osservazioni mostrano che il prolungamento della fotofase ha determinato una redistribuzione delle attività dei suini durante la fase di luce. Come indicato, il prolungamento della fotofase non ha impedito al gruppo L di riposare anche durante le ore di luce, e la percentuale ridotta di tempo che gli animali hanno dedicato all'esplorazione durante la fotofase indica come, di fatto, il loro comportamento esplorativo non sia aumentato, ma sia stato redistribuito durante le ore di luce.

Nelle nostre precedenti ricerche, un incremento da 8 a 14 ore di luce a 70 lux aveva determinato un significativo aumento dell'IPG e un tendenziale innalzamento del peso alla macellazione (Martelli et al., 2005; Sardi et al., 2012), mentre una variazione nelle intensità luminose (40 vs. 80 lux) non aveva determinato alterazioni nei parametri produttivi (Martelli et al., 2010). Si può pertanto concludere che l'ulteriore aumento nella durata del fotoperiodo oggetto della presente ricerca (8 vs. 16 ore di luce al giorno), sebbene applicato alla minima intensità luminosa prevista per legge, abbia avuto un effetto ancora più evidente sull'accrescimento corporeo, confermando inoltre l'osservazione che la durata della luce determini effetti maggiori rispetto alla sua intensità.

E' necessario comunque evidenziare come questo effetto positivo sui parametri produttivi non abbia avuto ricadute negative in termini di qualità delle carni o del grasso. L'aumento nella durata del fotoperiodo, infatti, ha determinato un aumento nello spessore del grasso sottocutaneo nel gruppo L (probabilmente dovuto al maggiore sviluppo corporeo, come spiegato in precedenza), a sua volta associato ad un aumento del contenuto in MUFA e riduzione dei PUFA, con aumento del rapporto MUFA/PUFA. Questi risultati possono essere interpretati come una conseguenza dei diversi pesi di macellazione: infatti, un aumentato peso di macellazione è associato ad una riduzione nel grado di insaturazione degli acidi grassi. L'aumento di spessore del lardo dorsale è stato associato ad un più elevato contenuto in SFA e MUFA e a una notevole riduzione nel contenuto in PUFA (Virgili et al., 2003; Lo Fiego et al., 2005), con conseguente calo del rapporto PUFA/SFA (Raj et al., 2010). Questa variazione

nella composizione acidica è da considerarsi positivamente, poiché rende possibile ottenere un grasso le cui caratteristiche sono più adatte per il processo di stagionatura, in quanto meno soggetto a fenomeni di ossidazione lipidica. Nella presente prova, sebbene la differenza fra i gruppi sperimentali non fosse significativa, ridotti valori di TBARS e perossidi sono stati osservati nel grasso sottocutaneo proveniente dai prosciutti del gruppo L, indice una maggiore resistenza all'ossidazione durante la stagionatura.

Nel complesso, i risultati di questa prova sono in linea con quanto riportato da altri Autori italiani riguardo alla composizione acidica delle cosce fresche (Scipioni and Martelli, 2001; Virgili et al., 2003; Lo Fiego et al., 2005; Pugliese et al., 2006; Mordenti et al., 2012; Nannoni et al. 2013a; 2013b). Il numero di iodio, al di sotto di 70 per tutte le cosce, è in accordo con le indicazioni del Disciplinare di produzione del Prosciutto di Parma. La resa in prosciutto e i cali di peso durante la stagionatura riflettono i diversi pesi iniziali delle cosce e nel complesso i cali di peso sono stati più contenuti nel gruppo L, il che ha consentito una resa produttiva più elevata.

Per quanto riguarda la qualità dei prosciutti stagionati, l'unica differenza significativa è stata osservata a carico del contenuto in sodio cloruro, che è risultato più basso nei prosciutti del gruppo L. Ancora una volta, questa differenza è verosimilmente dovuta al peso più elevato delle cosce del gruppo L, che potrebbe aver rallentato la penetrazione del sale. Il ridotto contenuto di sale è da considerarsi favorevolmente in termini di nutrizione umana (Ruusunen and Puolanne, 2005). Infine, l'analisi sensoriale dei prosciutti stagionati non ha rivelato alcuna differenza significativa fra i gruppi sperimentali in termini di colore e consistenza della porzione magra e del grasso, sebbene i prosciutti del gruppo L abbiano ricevuto una valutazione complessiva più favorevole, probabilmente a causa della loro migliore omogeneità di colore nella porzione magra e della loro adiposità leggermente superiore.

CONCLUSIONI

I fabbisogni specifici dei suini in termini di illuminazione sono legati alle loro necessità di ricevere un appropriato input sensoriale e di esprimere il loro repertorio comportamentale. Le nostre prove precedenti hanno dimostrato come un moderato aumento nell'intensità della luce e/o nella sua durata possano influenzare positivamente il benessere e/o i parametri produttivi dei suini pesanti (Martelli et al. 2005, 2010) senza provocare effetti negativi sui prosciutti stagionati (Sardi et al., 2012). I risultati della presente prova mostrano come, purché sia garantita un'adeguata fase di buio per il riposo, un ulteriore aumento nella durata del fotoperiodo (fino a 16 ore di luce al giorno) possa, anche alla minima intensità luminosa raccomandata dalla legge, migliorare da un lato i parametri di accrescimento e dall'altro le qualità nutrizionali e tecnologiche dei prosciutti, senza avere effetti negativi sul comportamento animale.

Allevare suini in condizioni di semioscurità al fine di evitare i comportamenti aggressivi è da considerarsi pertanto come una pratica priva di fondamento; al contrario, aumentare le ore di luce non altera la capacità dei suini di riposare né li rende più irrequieti. Pertanto i problemi comportamentali, quali le aggressioni o le morsicature, provocate da inadeguate condizioni di allevamento, dovrebbero essere risolti agendo sulle cause alla loro origine (scarso spazio pro capite, inadeguatezza dell'alimento, ambiente povero di stimoli) piuttosto che riducendo l'illuminazione ambientale come viene ancora fatto in maniera impropria da alcuni allevatori.

Questo contributo rappresenta una traduzione e un riadattamento dell'articolo "Growth parameters, behaviour, meat and ham quality of heavy pigs subjected to photoperiods of different duration", Martelli et al. (2015), Journal of Animal Science 93:758-766.

BIBLIOGRAFIA

- AOAC (2006) "Official Methods of Analysis". 18th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Gaithersburg, MD.
- Baldwin B.A., Start I.B. (1985) "Illumination preferences of pigs". *App. Anim. Behav. Sci.* 14, 233–243.
- Claus R., Weiler U. (1994) "Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review". *Livest. Prod. Sci.* 37, 245–260.
- Careri M., Mangia A., Barbieri G., Bolzoni L., Virgili R., Parolari G. (1993) "Sensory Property Relationships to Chemical Data of Italian type Dry-cured Ham". *J. Food Sci.* 58, 968–972.
- Consorzio del Prosciutto di Parma (1992). "Prosciutto di Parma, Denominazione di Origine Protetta. Disciplinary generale e dossier". http://www.prosciuttodiparma.com/pdf/it_IT/disciplinare.28.11.2013.it.pdf.
- Dubreuil P., Lapierre H., Pelletier G., Petitclerc D., Couture Y., Gaudreau P., Morisset J., Brazeau P. (1988) "Serum growth hormone release during a 60-hour period in growing pigs". *Dom. Anim. End.* 5, 157–164.
- EFSA - European Food Safety Authority (2007) "Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission on Animal health and welfare in fattening pigs in relation to housing and husbandry". *EFSA Journal* 564, 1–14.
- European Council (2008) "Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs (codified version)". *OJEU L* 47, 5–13.
- Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues". *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Honikel K.O. (1998) "Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat". *Meat Sci.* 49, 447–457.
- Jin J., Yaegashi T., Sawai K., Hashizume T. (2012). "Effects of photoperiod on the secretion of growth hormone in female goats". *Anim. Sci. J.* 83, 610–616.
- Laurentie M.P., Barenton B., Charrier J., Garcia-Villar R., Marnet P.G., Blanchard M., Toutain P.L. (1989) "Instantaneous secretion rate of growth hormone in lambs: relationships with sleep, food intake and posture". *Endocrinology* 125, 642–651.
- Lo Fiego D.P., Santoro P., Macchioni P., De Leonibus E. (2005) "Influence of genetic type, live weight at slaughter and carcass fatness on fatty acid composition of subcutaneous adipose tissue of raw ham in the heavy pig". *Meat Sci.* 69, 107–114.
- Martelli G., Boccuzzi R., Grandi M., Mazzone G., Zaghini G., Sardi L. (2010) "The effects of two different light intensities on the production and behavioural traits of Italian Heavy pigs". *Berl. Munch. Tierarztl.* 123, 10–15.
- Martelli G., Sardi L., Stancampiano L., Govoni N., Zannoni A., Nannoni E., Forni M., Bacci M.L. (2014). "A study on some welfare-related parameters of hDAF transgenic pigs when compared to their conventional close relatives". *Animal* 8, 810–816.
- Martelli G., Scalabrin M., Scipioni R., Sardi L. (2005) "The effects of the duration of the artificial photoperiod on the growth parameters and behaviour of heavy pigs". *Vet. Res. Comm.* 29(Suppl. 2), 367–369.
- Mordenti A.L., Martelli G., Brogna N., Nannoni E., Vignola G., Zaghini G., Sardi L. (2012) "Effects of a soybean-free diet supplied to Italian heavy pigs on fattening performance, and meat and dry-cured ham quality". *It. J. Anim. Sci.* 11, 459–465.
- Nannoni E., Martelli G., Cecchini M., Vignola G., Giammarco M., Zaghini G., Sardi L. (2013a) "Water requirements of liquid-fed heavy pigs: Effect of water restriction on growth traits, animal welfare and meat and ham quality." *Livest. Sci.* 151, 21–28.

- Nannoni E., Martelli G., Parazza P., Zaghini G. Sardi L. (2013b) "The effects of soybean press cake on productive traits and meat quality of Italian heavy pigs intended for Parma ham production". *Acta Agriculturae Slovenica Suppl.* 4, 81-84.
- Parolari G., Virgili R., Schivazappa C. (1994) "Relationship between cathepsin B activity and compositional parameters in dry-cured hams of normal and defective texture". *Meat Sci.* 38, 117-122.
- Pugliese C., Franci O., Acciaioli A., Bozzi R., Campodoni G., Sirtori F., Gandini G. (2006) "Physical, chemical and technological traits of dry cured ham of Cinta Senese pigs reared outdoors and indoors". *It. J. Anim. Sci.* 5, 265-276.
- Raj S., Skiba G., Weremko D., Fandreyewski H., Migdal W., Borowiec F., Polawska E. (2010) "The relationship between the chemical composition of the carcass and the fatty acid composition of intramuscular fat and backfat of several pig breeds slaughtered at different weights". *Meat Sci.* 86, 324-330.
- Ruusunen M., Puolanne E. (2005). "Reducing sodium intake from meat products". *Meat Sci.* 70, 531-541.
- Sardi L., Nannoni E., Grandi M., Vignola G., Zaghini G., Martelli G. (2012) "Meat and ham quality of Italian heavy pigs subjected to different illumination regimes". *Berl. Munch. Tierarztl.* 125.11/12, 463-468.
- Scipioni R., Martelli G. (2001) "Consequences of the use of ensiled sugar beet-pulp in the diet of heavy pigs on performances, carcass characteristics and nitrogen balance: a review". *Anim. Feed Sci. Technol.* 90, 81-91.
- Taylor N., Prescott N., Perry G., Potter M., Le Sueur C., Wathes C. (2006) Preference of growing pigs for illuminance. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 96, 19-31.
- Van Putten G., Elshof W.J. (1984) "The influence of three light levels on the behaviour of fattening pigs". *KTBL Schrift.* 199, 197-216.
- Virgili R., Degni M., Schivazappa C., Faeti V., Poletti E., Marchetto G., Pacchioli M.T., Mordenti A. (2003) "Effect of age at slaughter on carcass traits and meat quality of Italian heavy pigs". *J. Anim. Sci.* 81, 2448-2456.
- Virgili R., Parolari G., Schivazappa C., Soresi Boldrini C., Volta R. (1998) "Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham". *J. Food Biochem.* 22, 53-63.
- Virgili R., Schivazappa C. (2002) "Muscle traits for long matured dried meats". *Meat Sci.* 62, 331-343.
- Virgili R., Toscani T., Schivazappa C., Mazzotta L., Manfredini R., Portaluppi F. (2002) "Effect of seasonal changes on muscle cathepsin B activity and pH 24h of Italian heavy pig". In: *Proc. 48th Int. Congr. Meat Sci. Technol.*, Rome, Italy. 25-30 August 2002, p. 600-601.
- Wang B., Pace R.D., Dessai A.P., Bovell-Benjamin A., Phillips B. (2002) "Modified extraction method for determining 2-Thiobarbituric acid values in meat with increased specificity and simplicity". *J. Food Sci.* 67, 2833-2836.

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2015

IMPATTO DI ALCUNI PARAMETRI GESTIONALI SUL BENESSERE DELLE SCROFE ALLEVATE IN BOX COLLETTIVI

EFFECT OF SOME MANAGMENT PARAMETERS ON THE WELFARE OF SOWS BRED IN COLLECTIVE CORRALS

MORANDO S.¹, MARTANO G.², TOMASSONE L.¹, TARANTOLA M.¹

¹Università degli Studi di Torino. Dipartimento di Scienze Veterinarie;

²Dirigente ASL TO3, sanità animale.

Parole chiave: benessere, scrofe, comportamento, parametri gestionali.

Key words: welfare, sows, behavior, managment parameters.

Riassunto

Con il presente lavoro si è voluto analizzare l'impatto di alcuni parametri gestionali sul benessere delle scrofe e scrofette allevate in box collettivi a partire dal 28° giorno di gestazione fino al trasferimento in sala parto (D. L. n°122, Luglio 2011). Sono stati presi in considerazione l'età dell'animale, il numero di soggetti formanti il gruppo, le misure gestionali adottate dall'allevatore per ridurre l'aggressività degli animali e la tecnica di stabulazione utilizzata in precedenza. Lo studio è stato svolto in 12 allevamenti. In tutte le aziende sono state effettuate due visite: la prima entro tre giorni dalla commistione degli animali e la seconda dopo 10-15 giorni. Durante le visite è stata compilata una *check-list* riportante le informazioni generali dell'allevamento. E' stato quindi svolto uno studio comportamentale che riportava la presenza di lesioni, di stereotipie, e l'etogramma. Si è riscontrato che il numero di lesioni e di scontri diminuisce nel corso del tempo, al contrario la presenza di suini manifestanti stereotipia risulta essere maggiore durante la seconda osservazione. Le scrofe hanno riportato il maggior numero di stereotipie e scontri mentre le scrofette una maggiore incidenza di lesioni. Considerate le dimensioni del gruppo, i gruppi grandi (20-25 suini) hanno mostrato dati migliori rispetto ai medi (6-9 suini) ed intermedi (10-15 suini). Tra le misure preventive, la selezione genetica per ridurre l'aggressività risulta essere la più efficace.

Abstract

The aim of this work was to analyze the impact of some management paremeters on the welfare of sows and gilts bred in collective boxes, from 28th of pregnancy till the transfer into labor rooms (D. L. n°122, July 2011). Four different factors were considered: animals' age, dimension of groups, preventives measures adopted by the farmer in order to reduce the animals' aggressiveness and the housing technique that was previously adopted. The study was applied on 12 farms, which were visited twice: the first visit occured three days after the commingling of animals and the second one 10-15 days later. During each visit, a check-list with the breeding's information was compiled. A behavioural' study was conducted by evaluating the "Lesion score", stereotypes and the ethogram. An decrease in time in the number of injuries and fights was observed, while, sows show more stereotypes during the second observation. A major number of stereotypes was observed in sows compared to gilts, which had a higher prevalence of injuries. As regards the group dimensions, groups composed by 20-25 sows showed better results than groups with median (6-9 sows) and intermediates (10-15 sows) dimensions. Among preventive measures, the genetic selection in order to reduce the animals aggressiveness was shown to be the most effective.

INTRODUZIONE

Lo studio e la tutela del benessere animale è una tematica che sempre più riveste un ruolo importante nell'allevamento del suino, alla luce anche della nuova normativa europea entrata in vigore in Italia con il D. Lgs. 7 luglio 2011, n°122 (dir. 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini).

La letteratura riporta diversi punti critici responsabili della riduzione del benessere delle scrofe in allevamento intensivo, quali la dimensione, l'omogeneità e la stabilità del gruppo (Hemsworth et al, 2013; Wang et al. 2012; Grandin et al 2010), l'età degli animali (Jensen, 1994). Sono stati quindi analizzati alcuni di questi parametri gestionali in allevamenti dove erano presenti sia scrofe che scrofette, ed è stato valutato lo stato di benessere e di stress sociale utilizzando dei parametri basati sulle osservazioni dirette sugli animali (Sundrum, 1997), quali le stereotipie (Glone, 2013), il *Lesion score* (Wang et al, 2012; Leeb et al, 2001; Smulder et al, 2008) e l'etogramma (Wemelsfelder et al, 2001).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato svolto in 12 allevamenti suini in provincia di Cuneo visitati nel periodo compreso tra dicembre 2013 ad aprile 2014.

In tutti gli allevamenti sono state compiute due visite da un unico operatore: la prima entro tre giorni dalla formazione del gruppo, ovvero dalla commistione degli animali, e la seconda a distanza di 10-15 giorni dalla precedente. Complessivamente sono stati osservati 200 animali durante la prima osservazione e 196 nel corso della seconda (alcuni animali sono stati trasferiti a causa dei forti scontri).

In occasione della prima ispezione in allevamento è stata compilata una *check-list* riportante tutte le informazioni generali dell'allevamento (personale, descrizione dei locali, sistema di alimentazione e abbeveraggio, spazio disponibile, libertà di movimento, pavimentazioni, materiale manipolabile, sala parto etc...).

In occasione delle due visite sono stati osservati i gruppi di suini in tre diverse fasce orarie per una durata di 10 minuti. Durante ogni osservazione, è stato svolto uno studio comportamentale che riportava:

1.*Lesion score*: è stato riportato il numero di soggetti presentanti lesioni e le diverse sedi anatomiche colpite.

2.Stereotipie: nel corso di ogni osservazione è stato riportato il numero di soggetti manifestanti stereotipia. Per quanto riguarda la tipologia sono state considerate quelle tipiche della specie suina, soprattutto le stereotipie orali.

3.Etogramma: descrizione degli scontri e delle interazioni sociali che nei suini si riferiscono prevalentemente a minaccia, aggressione e sostituzione/sottomissione (Ewbank et al, 1971, 1972). L'etogramma utilizzato è stato quello messo a punto da Jensen nel 1980. E' stata scelta casualmente una fascia oraria nel corso della quale sono stati osservati gli animali ed è stato riportato: il numero di scontri osservati e di soggetti coinvolti, la tipologia di lotta utilizzata. Abbiamo calcolato la prevalenza (P) delle lesioni e dei comportamenti osservati con intervalli di confidenza al 95% (IC 95%) prendendo in considerazione l'età dell'animale, la dimensione del gruppo, le misure preventive utilizzate dall'allevatore per ridurre l'aggressività e la tipologia di allevamento utilizzata in precedenza.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il programma Winepi (<http://www.winepi.net/>).

Il secondo parametro gestionale analizzato è stato la dimensione del gruppo. Si è deciso di scegliere questa variabile, perchè la stessa normativa impone l'allevamento in gruppo dopo i 28 giorni dalla fecondazione

Le misure preventive, ovvero le soluzioni gestionali utilizzate dagli allevatori per ridurre l'aggressività fra gli animali erano le seguenti: nessuna; genetica; box di maggiori dimensioni rispetto alla richieste della normativa; commistione all'aperto (gli allevatori scelgono di effettuare la commistione degli animali in un box spesso molto esteso all'aperto e di mantenervi i suini all'interno per una durata media di 8 ore, successivamente, le scrofe vengono spostate all'interno dei box in cui rimarranno fino al parto); utilizzo di un sedativo neurolettico, della classe dei butirfofenoni.

E' stato quindi elaborato un questionario somministrato agli allevatori con l'obiettivo di conoscere la loro opinione, in merito alla vigente normativa. E' stato chiesto loro di evidenziare gli svantaggi e i vantaggi dell'allevamento delle scrofe in box collettivi, se a loro parere siano stati raggiunti gli obbiettivi dell'Unione Europea e infine se, per adeguarsi alla normativa, abbiano dovuto sostenere dei costi e i tempi di ammortamento.

RISULTATI

Considerando l'età dell'animale ed i risultati del *Lesion score* le scrofette hanno riportato il maggior numero di lesioni: prima osservazione $P= 43.0\%$ (IC95% 32.4-52.1) vs $P= 35.0\%$ (IC95% 25.5-44.2) delle scrofe; seconda osservazione $P= 35.1\%$ (IC95% 25.5-44.8) vs $P= 22.5\%$, (IC95% 14.4-30.7) delle scrofe. Le scrofette hanno presentato inoltre la più ampia varietà di sedi anatomiche colpite dalle lesioni.

Le scrofe invece hanno manifestato la percentuale maggiore di comportamenti stereotipati: nella prima osservazione $P= 5.8\%$ (IC95% 1.3-10.3) vs $P= 3.1\%$ (IC95% 0.0-6.5) delle scrofette; nella seconda osservazione $P= 7.8\%$ (IC95% 2.63-13.1) vs $P= 7.5\%$ (IC95% 2.1-12.7) delle scrofette.

L'etogramma ha rivelato che le scrofe presentavano, sia alla prima che alla seconda osservazione, un numero maggiore di scontri e una più ampia varietà rispetto alle scrofette (Tabella 1 e 2)

Tabella n°1: etogramma rilevato nella prima osservazione.

Table n °1: ethogram related to the first observation.

TIPOLOGIA SCONTRO	SCROFE	SCROFETTE
Pressing parallelo	6	4
Colpo testa- testa	6	0
Colpo testa- testa con morso	18	3
Colpo testa-corpo	4	0
Colpo testa-corpo con morso	38	4
Leva	7	0
Naso- naso	1	0
Naso corpo	0	2
Naso genitale	1	6

Tabella n°2: etogramma rilevato nella seconda osservazione.

Table n° 2: ethogram related to the second observation.

TIPOLOGIA SCONTRO	SCROFE	SCROFETTE
Pressing parallelo	0	0
Colpo testa- testa	1	0
Colpo testa- testa con morso	8	3
Colpo testa-corpo	8	0
Colpo testa-corpo con morso	10	1
Leva	0	0
Naso- naso	1	0
Naso corpo	1	0
Naso genitale	0	1

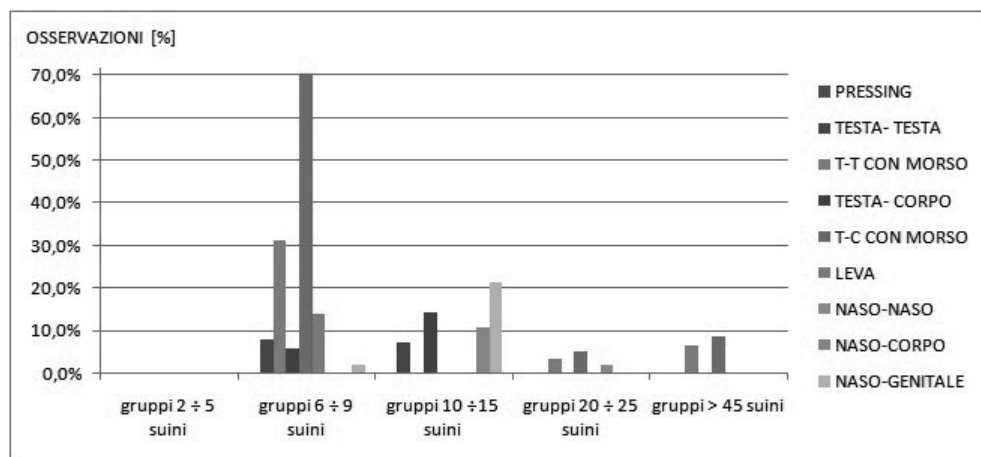
Il secondo parametro gestionale analizzato è stato la dimensione del gruppo. Negli allevamenti che presentavano gruppi maggiori di 40 animali, gruppi “giganti”, nessun allevatore ha optato per la riduzione dello spazio disponibile nonostante la normativa lo consentisse.

Il minor numero di lesioni, stereotipie espresse sono state rilevate nei gruppi “grandi” (20-25 suini).

In questi, le lesioni erano presenti nella prima e nella seconda osservazione, nel 11.0% degli animali (IC95% 3.4-19.2). Le stereotipie hanno presentato nella prima osservazione e nella seconda osservazione una P= 1.6% (IC95% 0.0-4.8).

Anche gli scontri, come si può vedere nel grafico n.1, sono risultati in numero minore in questo gruppo composto da 20-25 suini.

Figura 1. Etogramma rilevato nella prima osservazione.
Figure1. Ethogram related to the first observation.



Nei gruppi piccoli (2-5 suini) la prevalenza di lesioni riscontrate era del 54.6% (IC95% 25.2-84.0) nella prima osservazione, 84.6% (IC95% 65.0-100.0) nella seconda mentre le stereotipie 18.2% (IC95% 0.0-41.0) nella prima e 7.7% (IC95% 0.0-22.2) nella seconda osservazione.

Nella prima osservazione questo gruppo non ha manifestato scontri (grafico 1), mentre nella seconda osservazione sono stati rilevati 6 scontri del tipo naso-genitale.

Nei gruppi giganti le lesioni riguardavano il 34.8% degli animali (IC95% 21.1-48.6) nella prima osservazione e il 35.6 % (IC95% 21.7-49.5) nella seconda. Nella prima osservazione non abbiamo registrato stereotipie, che nella seconda colpivano invece il 6.7% degli individui (IC95% 0.0-13.9).

Nella prima osservazione i gruppi giganti hanno manifestato 4 scontri del tipo pressing in parallelo e 3 del tipo colpo testa-testa con morso e 4 colpo testa-corpo con morso.

Nella seconda osservazione questi gruppi hanno manifestato 3 scontri del tipo pressing in parallelo e 1 del tipo colpo testa-testa con morso (grafico 1).

Nei gruppi medi (6-9 suini) le lesioni sono state riscontrate nel 49.0% (IC95% 35.3-62.7) e nel 32.0% (IC95% 18.1-44.9) degli animali rispettivamente nella prima e seconda osservazione. La prevalenza di stereotipie nella prima osservazione è del 7.8% (IC95% 0.5-15.2) e nella seconda del 16.0% (IC95% 5.8-26.3).

Nella prima osservazione questo gruppo ha manifestato il maggior di scontri (n=61 grafico 1), mentre nella seconda osservazione sono stati osservati 8 colpo testa-corpo (con o senza morso) 3 colpo testa-testa (con o senza morso) e 1 leva.

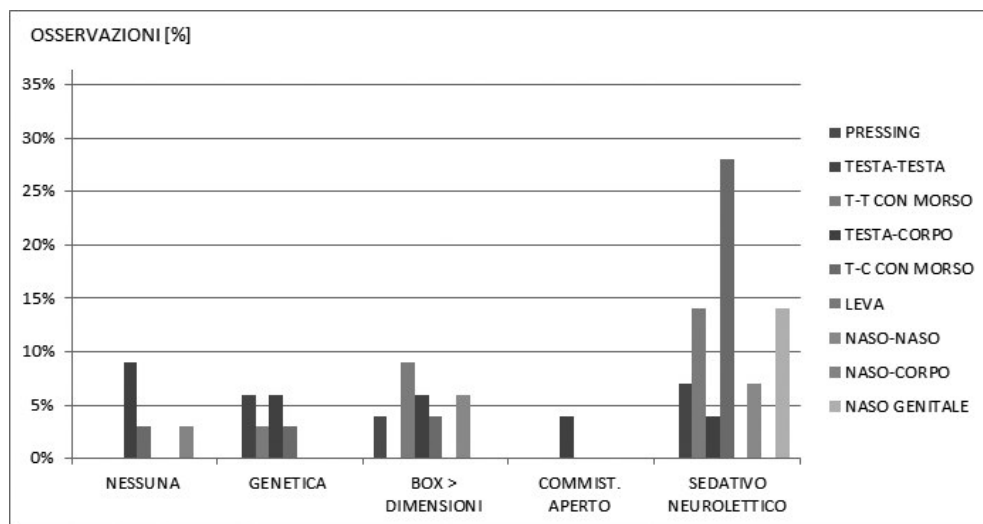
Nei gruppi di dimensioni intermedie (10-15 suini) le lesioni colpivano il 39.3% (IC95% 21.2-57.4) dei suini, nella prima osservazione e il 64.3% (IC95% 46.5-82.0) nella seconda. Le stereotipie nella prima osservazione erano presentate dal 3.6% (IC 0.0-10.5), e nella seconda osservazione dal 21.4% (IC95% 8.3-41.0).

Nella prima osservazione questo gruppo ha manifestato 2 scontri tipo colpo testa-testa, 4 colpo testa-corpo, 3 naso-corpo e 6 naso-genitale (grafico 1), nella seconda osservazione questo gruppo ha mostrato il maggior numero di scontri (n=26).

Per quanto riguarda le misure preventive adottate dagli allevatori, il *Lesion score* di chi pratica una selezione genetica indica alla prima e alla seconda osservazione la presenza di lesioni nel 11.8% (IC95% 2.9-20.6) e 9.8 % (IC95% 1.6-18.0) dei soggetti. Tali prevalenze sono pari al 60.0% (IC95% 35.2-84.8) 35.7 % (IC95% 10.6-60.8) quando viene adottato un tranquillante. Anche per le stereotipie l'uso del tranquillante corrisponde alle prevalenze più alte (prima osservazione 13.3% IC95% 0.0-30.5; 21.4%, IC95% 0.0-42.9). Le stereotipie diminuiscono se l'allevatore utilizza la selezione o box più grandi. Anche l'etogramma riporta i dati migliori nel caso della selezione genetica (grafico 2).

Figura 2. Etogramma rilevato nella seconda osservazione.

Figure 2. Ethogram related to the second observation.



Abbiamo valutato il benessere in base alla tipologia di allevamento precedentemente utilizzata. Come già affermato in precedenza, dei 12 allevamenti ispezionati solo 7 hanno dovuto adeguarsi alla normativa (allevamenti "A"), in quanto utilizzavano solo l'allevamento in gabbia per tutta la durata della gestazione. Gli altri 5 allevamenti (allevamenti "B") utilizzavano sia la gabbia nel periodo successivo alla fecondazione, per 40 giorni, che una stabulazione in gruppo in box per la durata di due mesi fin al trasferimento in sala parto. Con l'applicazione della normativa, il periodo in gabbia è stato ridotto a 28 giorni. Il *Lesion score* ha indicato prevalenze maggiori negli allevamenti B sia alla prima (B:42.6%, IC95% 32.9-52.2; A:27.3%, IC95% 18.5-36.1) che alla seconda osservazione (B:39.4%, IC95% 29.8-49.1; A:22.7%, IC95% 14.4-31.1), mentre per le stereotipie solo nella seconda osservazione la prevalenza è risultata maggiore (B:10.1%, IC95% 4.2-16.0; A:6.2%, IC95% 1.4-11.0). L'etogramma ha dato i risultati peggiori nella prima osservazione per la tipologia B, nella seconda osservazione per la tipologia di allevamento A.

In merito alle interviste agli allevatori, il 54.5% ha espresso un'opinione positiva sulla normativa vigente, il 36.6% negativa e il 9.0 % mediocre. Secondo la metà degli

intervistati l'UE ha raggiunto lo scopo prefissato, ovvero tutelare il benessere delle scrofe in gestazione, mentre per 4 allevatori la risposta è stata negativa e per due sono stati raggiunti gli scopi solamente in parte.

Fra i vantaggi più spesso evidenziati sono stati riportati: una maggiore dinamicità dell'animale e di conseguenza un minor numero di problematiche durante il parto, un diminuito numero di zoppie in quanto sempre in gabbia sforzava gli arti proprio nel momento del trasferimento in sala parto. Fra gli svantaggi, riportati in numero maggiore, è stato sottolineato: maggiori costi in termini di lavoro, una precoce riforma degli animali, un numero maggiore di zoppie e soprattutto gli squilibri alimentari derivanti dalle lotte gerarchiche.

Il 41.6% degli allevatori non ha sostenuto nessun costo in quanto utilizzava tale metodo di allevamento già in precedenza. Tra i restanti allevatori, 3 hanno sostenuto costi inferiori a 3.000€, due compresi tra i 10.000-50.000€ e due superiori ai 200.000€. In quest'ultimi due casi il numero di scrofe stabulate è notevolmente aumentato (quasi raddoppiato); si tratta degli allevamenti di maggiori dimensioni. Infine, tra gli allevatori che hanno sostenuto delle spese per adeguarsi alla vigente normativa, tre hanno dichiarato che pensano di recuperare i soldi investiti in un arco di tempo breve (6-12 mesi), due nel corso di 10 anni e due hanno affermato che non riusciranno ad ammortizzare i costi sostenuti.

DISCUSSIONE

La prevalenza di animali riportanti lesioni, considerate tutte le sedi ed un'unica lesione per soggetto, diminuisce sempre nel corso del tempo per tutte le variabili considerate. Questo è imputabile alla gerarchia che si deve formare nel primo periodo del raggruppamento. Le lotte vengono in seguito sostituite da atteggiamenti di minaccia contraddistinti da forti grugniti e da finti attacchi frontali da parte del soggetto dominante (Jensen et al, 1994). La sede anatomica in cui più sovente sono state osservate le lesioni è il tronco, mentre gli arti posteriori, l'area genitale e la coda sono risultate le zone meno colpite; questo potrebbe essere legato alla competizione per il cibo (Leeb et al, 2001).

Al contrario, la prevalenza di suini, manifestanti stereotipie, ha un andamento temporale opposto rispetto ai dati ottenuti mediante il *Lesion score*. Infatti questa aumenta nel corso del tempo in tutte le osservazioni effettuate, indicando una situazione di stress persistente (White et al., 1991; Stone, 1964).

Il comportamento stereotipato più frequentemente espresso era la masticazione a vuoto. E' stato dimostrato che questa attività compare in genere nelle scrofe soprattutto in stabulazione individuale, ma talvolta anche in gruppo spesso vicino ai momenti di alimentazione, è quindi associabile alla disponibilità di cibo (Bergeron et al, 1997).

Inizialmente si riteneva che questi comportamenti fossero determinati dalla povertà ambientale che impediva agli animali di esprimere il loro normale repertorio comportamentale. Questa teoria è stata abbandonata in seguito alla dimostrazione che questi comportamenti stereotipati venivano quasi completamente annullati aumentando l'assunzione alimentare giornaliera da 1.25 a 4.00 kg/giorno (Appleby and Lawrence, 1989).

L'automanipolazione, la tolettatura eccessiva, lo sfregarsi contro strutture fino a prodursi lesioni, l'alimentazione continua e il girare in circolo rappresentano le stereotipie meno osservate.

Secondo quanto riportato in letteratura (McGlone, 1986, Meese et al, 1973), il numero

di lotte fra suini appartenenti allo stesso gruppo, diminuisce con il trascorrere del tempo dal momento della commistione, se si evitano opportunamente le introduzioni di nuovi soggetti. La motivazione di tale andamento risiede nella natura del comportamento della specie suina in quanto le lotte sono lo strumento necessario per lo stabilirsi della gerarchia all'interno del gruppo. Una volta che questa si è stabilita, il numero di scontri diminuisce notevolmente. Nell'elaborazione dei dati ottenuti dall'etogramma non è stato possibile calcolare la prevalenza di scontri, in quanto uno stesso soggetto, nel corso della medesima fascia oraria, può dar vita ad un numero ripetuto di lotte con gli stessi suini o con individui diversi, ma i risultati ottenuti nel nostro studio, considerando solamente il numero di scontri espresso in percentuale rispecchia quanto precedentemente osservato dagli altri autori.

La tipologia di scontro più osservata è stata il “testa-testa” e “testa-corpo” con o senza morso.

Considerando il fattore età, si è osservato che le scrofette presentavano, rispetto alla scrofe, il maggior numero di lesioni e la più ampia varietà di sedi anatomiche interessate, pur manifestando meno atteggiamenti aggressivi. Nel nostro studio quindi gli animali più giovani avevano scontri di intensità maggiore, pur avendo meno contatti tra di loro. Questo è in contrasto con quanto riportato dal lavoro di Parente et al (2012).

Nel nostro lavoro, le scrofe infatti hanno manifestato una maggiore prevalenza di stereotipie rispetto alle scrofette, questo perché gli animali più vecchi compensano la mancanza di arricchimento ambientale manifestando le stereotipie (Mason et al, 2004).

Riguardo la dimensione dei gruppi il minor numero di lesioni e di stereotipie e di scontri si è rilevato nei gruppi grandi (20-25 suini) e rimanendo invariato nel tempo. I gruppi che presentano maggior numero di lesioni e di scontri alla prima osservazione sono quelli costituiti da 6-9 soggetti; tali fenomeni diminuiscono nel tempo. I gruppi intermedi (10-15 soggetti) e i piccoli (2-5 suini) invece presentano un aumento del numero di lesioni e di scontri nel tempo. Ciò contrasta con quanto ottenuto in un lavoro dall'università di Milano secondo cui quando i suini vengono mantenuti in gruppi stabili di 8-10 soggetti, rispecchiando la situazione naturale degli animali allo stato brado, si registrano dei livelli di benessere maggiore più elevati (Tosi et al, 2003).

Negli allevamenti con gruppi di 40 animali, “giganti”, nessun allevatore ha optato per la riduzione dello spazio disponibile nonostante la normativa lo consentisse. In tal modo gli allevatori hanno optato per una scelta meno produttiva, in quanto gli impianti non sono sfruttati al massimo dell'efficienza, ma che garantisce un minore numero di scontri e quindi un maggior benessere degli animali.

Per quanto riguarda le misure preventive adottate dagli allevatori l'utilizzo dei tranquillanti ha dato i risultati peggiori in termini di prevalenza di *Lesion score* e stereotipie. La selezione genetica, per ridurre l'aggressività, sembra essere invece un fattore rilevante per il benessere dei suini, in quanto ha permesso di ridurre le lesioni, le stereotipie e gli scontri che la adottano.

Il tranquillante veniva somministrato a tutti gli animali e non solo a quelli aggressivi, non solo in caso di necessità ma come pratica di routine, e non veniva consultato un medico veterinario, prima della somministrazione. Questa pratica quindi è decisamente da scoraggiare, non solo perché non conforme alla legge vigente ma anche alla luce dei risultati ottenuti dal presente lavoro.

I risultati ottenuti valutando la tipologia di allevamento precedentemente utilizzata sono,

contrastanti, in quanto gli animali già abituati a stare nei box presentano in realtà il maggior numero di lesioni, stereotipie e scontri nel corso della prima osservazione. Tali dati necessitano quindi di ulteriori approfondimenti, valutando eventuali associazioni con altri parametri gestionali.

Secondo la metà degli allevatori intervistati il livello di benessere delle scrofe è maggiore mantenendo gli animali in gruppo. La maggior parte di questi allevatori, infatti, utilizza tale tipologia di allevamento già da prima delle imposizioni legislative.

L'altra metà degli intervistati reputa la normativa non adeguata a garantire un maggior benessere agli animali. Questi sostengono che, proprio a causa dei gravi squilibri alimentari derivanti dall'allevamento in gruppo, il livello di benessere diminuisca.

Nella maggior parte dei casi non sono state sostenute spese per l'adeguamento degli impianti, sono state minime. I costi considerevoli sono stati riportati nelle aziende di grandi dimensioni, dovuti in parte anche all'aumentato numero di animali stabulati.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta una prima raccolta di dati, relativi al benessere dei suini dopo l'applicazione della nuova normativa. I risultati ottenuti verranno integrati con analisi su alcuni parametri ematici indicatori di stress, nonché dati produttivi e riproduttivi.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano: il Dott. Sona Bruno e il Dott. Romei Salvatore per aver contribuito alla realizzazione del progetto.

BIBLIOGRAFIA

- 1.Hemsworth P. H., Rice M., Nash J.,Giri K., Butler K.L.,TilbrookA. J. and R. Morrison R. S., (2013), "Effects of group size and floor space allowance on group housed sows: aggression, stress, skin injuries and reproductive performance", J. Anim. Sci, 4953-4964.
- 2.Li Y. Z., Wang L. H., Johnston L. J., (2012), "Sorting by parity to reduce aggression towards young sows in group-gestation housing systems." J. Anim. Sci, 4514-4522.
- 3.Grandin T., Johnson C., (2010), "Gli animali ci rendono umani",Clend (TN) Italia, 177-209, Mondadori Printing.
- 4.Jensen P., (1994), "Fighting between unacquainted pigs, effects of age and of individual reaction patter", Applied Animal Behaviour Sci., 12, 93-101.
- 5.Sundrum A, (1997), "Assessing livestock housing conditions in terms of animal welfare- possibilities and limitations", in Livestock farming systems - more than food production, 89, 238-241.
- 6.Mc Glone J., (2013), "Review: update scientific evidence on the welfare of gestating sows kept in different housing systems",The Professional Animal Scientist, 189-198.
- 7.Leeb, B., Ch. Leeb, J. Troxler and M. Schuh,(2001), "Skin lesion and callosities of group housed pregnant sows-animal related welfare indicators", in Acta Agric. Scand, Sect A, Animal Sci, Suppl. 30, 82-87.
- 8.White J., Kreeger T.J., Seal U.S. and Tester J.R., (1991), "Pathological responses of red foxes to capture in box trap", Wild J. Manage, 55, 75-80.
- 9.Stone A., (1964), "Consciousness:altered levels in blind retarded children" in Psychosom Med, .14-19.
- 10.Smulder D., Hautekiet V., Verbeke G., (2008), "Tail and ear biting lesions in pigs: an epidemiological study" in Animal welfare, 17, 61-69.

11. Wemelsfelder F., Hunter T. E. A., Mendl M.T., Lawrence A.B., (2001), "Assessing the whole animal: a free choice profiling approach" in *Animal Welfare*, 129-139.
12. Ewbank F.R., Meese G. B., (1971), "Aggressive behaviour in groups of domesticated pigs on removal and return of individuals" in *Anim. Behav.*, 20, 21-28.
13. Jensen P., (1980), "An ethogram of social interaction pattern in group-housed sows", *Applied Animal Ethology*, 6, 341-350.
14. <http://www.winepi.net>.
15. Bergeron R. and H.W. Gonyou, (1997), "Effects of increasing energy intake and foraging behaviour on the development of stereotypies in pregnant sows", *Appl. Anim Behav. Sci.*, 53, 259-270.
16. Lawrence A.B., Appleby M.C., Illius A.W., MacLeod H.A., (1989), "Measuring hunger in the pig using operant conditioning: the effect of dietary bulk" in *Anim. Prod.* 48, 213–220.
17. McGlone J.J., (1986), "Influence of resources on pig aggression and dominance" in *Behav. Processes*, 12, 135-144.
18. Meese G.B. and Ewbank R., (1973), "The establishment and nature of the dominance hierarchy in the domesticated pig" in *Anim. Behav.* 21, 326-334.
19. Parente J.P., Meunier-Salaun M.C., Vasseur E., Bergeron R., (2012), "Stability of social hierarchy in growing female pigs and pregnant sows", in *Animal Behavior Science*, 142, 1-10.
20. Mason G.J. and Latham N.R., (2004), "Can't stop, won't stop: is stereotypy a reliable animal welfare indicator?" in *Anim. Welf.* 13, 57-69.
21. Tosi M., Canali E., Mattiello S., Ferrante V., Carenzi C., Verga M., (2003), "Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento", Brescia, Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche.



Il Riferimento per
la **Prevenzione** e salute
della tua **Scrofaia**

www.hipra.com



We add performance to your business



HUVEPHARMA®

We add performance to your business



Huvepharma AD

5th Floor, 3a Nikolay Haytov Str.
1113 Sofia, **Bulgaria**
Tel.: +359 2 862-5331
Fax: +359 2 862-5334
e-mail: sales@huvepharma.com

Huvepharma NV

Uitbreidingstraat 80
2600 Antwerp, **Belgium**
Tel.: +32 3 288 1849
Fax: +32 3 289 7845
e-mail: customerservice@huvepharma.com

Contatti per l'Italia:

gabriele.festi@huvepharma.com
paolo.mondin@huvepharma.com



A SANOFI COMPANY

IL PRIMO



IL PRIMO VACCINO ASSOCIATO CONTRO PARVOVIROSI E MAL ROSSO DEI SUINI
CHIEDI AL TUO VETERINARIO



MSD

Animal Health



La Scienza per animali più Sani





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 Affarosa 4
42010 Rio Saliceto (RE)

TELEFONO / TELEPHONE:
+39 0522 640711

FAX:
+39 0522 649757
+39 0522 640716

**info@treivet.com
www.treivet.com**

One shot Rapido e Potente



Vétoquinol Italia S.r.l.
Via Piana, 265 - 47032 Bertinoro (FC) Italy
Tel. +39 0543 462411 - Fax. +39 0543 448644
www.vetoquinol.it - vetoquinol.italia@vetoquinol.com

Vétoquinol
Signe de passion

NON LASCIAMO CHE GLI ALLEVAMENTI ITALIANI
DIVENTINO SOLO UN RICORDO.



zoetis

