



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

**XLII**  
MEETING ANNUALE



Centro Fiera del Garda - Montichiari (BS)

**10-11 Marzo 2016**



In copertina: “Let’s party”, *Nicoletta Belletti* - [www.bellettinicoletta.it](http://www.bellettinicoletta.it)

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

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

**2016**

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini  
XLII Meeting Annuale, Montichiari (BS), 10-11 Marzo 2016.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2016.

ISBN 978-88-903311-8-3

## INDICE

Prefazione ..... p. 17

### ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

#### **“EVOLUZIONE E TENDENZE DEI MERCATI INTERNAZIONALI E IMPATTO DELLE MALATTIE: IL CASO PED”**

*Parma, 9 Ottobre 2015*

*Snelson H.*

DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO, L'ESPERIENZA DEGLI STATI  
UNITI ..... p. 23

*Ménard J.*

DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED), LA PROSPETTIVA  
CANADESE ..... p. 25

*Giacomini E.*

AGGIORNAMENTI SULLA SITUAZIONE PED IN ITALIA ..... p. 29

### ATTI DEL XLII MEETING ANNUALE

*Montichiari (BS), 10-11 Marzo 2016*

#### TAVOLA ROTONDA

#### **DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA: COME OTTIMIZZARE LE PERFORMANCE IN GESTAZIONE**

*Houben M.*

GESTIONE DELLA SCROFA IN GRAVIDANZA, QUALI SONO I FAT-  
TORI PIÙ IMPORTANTI PER OTTIMIZZARE LE PERFORMANCE?..... p. 41

*Bertacchini F.*

LA SCROFETTA: SOLUZIONI MANAGERIALI PER MASSIMIZZARE  
I RISULTATI ..... p. 43

#### TAVOLA ROTONDA

#### **DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA: QUANDO L'ALIMENTAZIONE E GLI ASPETTI SANITARI RAPPRESENTANO UN PUNTO CRUCIALE**

*Vincenzi R.*

DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA: L'ALIMENTAZIONE  
COME FATTORE STRATEGICO NELL'ALLEVAMENTO DEI MO-  
DERNI RIPRODUTTORI ..... p. 47

*Marco E., Romagosa A.*

L'INTEGRAZIONE DI PROTOCOLLI SANITARI NELLE  
SCROFETTE DA RIMONTA ..... p. 49

## COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

- Gambetta B., Perrone V., Gabrielli S., Cavallero S.*  
AGGIORNAMENTO DEL QUADRO EPIDEMIOLOGICO DI  
ASCARIS SPP. IN ITALIA ..... p. 57
- Polloni A., Archetti I., Avanzini C., Vinco L.J., Giacomelli S., Lombardi G.,  
Cecilian F., Lecchi C., Rota Nodari S.*  
BENESSERE DEI SUINETTI ALLA CASTRAZIONE: RISULTATI  
PRELIMINARI DELL'ESPRESSIONE DI ALCUNI MIRNA E  
CORTISOLO NELLA SALIVA ..... p. 61
- Tavella G., Scollo A., Mazzoni C., Contiero B., Gottardo F.*  
UTILIZZO DELL'ANESTESIA LOCALE DURANTE LA  
CASTRAZIONE DEL SUINETTO: VALUTAZIONE DEL DOLORE ..... p. 69
- Scollo A., Bottacini M., Gottardo F.*  
MONITORAGGIO AL MACELLO DELLE ULCERE GASTRICHE  
NEL SUINO PESANTE ITALIANO ..... p. 77
- Mazzoni C., Scollo A., Tavella G., Casappa P.*  
EFFETTO DI INDUZIONE ED ASSISTENZA DEL PARTO SULLE  
PERFORMANCE DI SCROFA E NIDIATA ..... p. 83
- Scollo A., Amorico A., Contiero B., Gottardo F., Salvini F., Veloci M., Mazzoni C.*  
IL MONITORAGGIO DELLE LESIONI AL MACELLO COME  
STRUMENTO SANITARIO SU BASE STAGIONALE ..... p. 89
- Scali F., Giacomini E., Lazzaro M., Vezzoli F., Rosignoli C., Paterlini F.,  
Nigrelli A., Boldini M., Prati P., Paolo P., Vitali A., Alborali G.L.*  
INDAGINE SU BIOSICUREZZA E CONSUMO DI ANTIMICRO-  
BICI IN 25 ALLEVAMENTI SUINI DA INGRASSO: CONFRONTO  
TRA DIVERSI STANDARD DI MISURAZIONE..... p. 97
- Raffi V., Scollo A., Mazzoni C., Migliori M.*  
EFFETTO DEI MONOGLICERIDI NEL PERIPARTO DELLA  
SCROFA: PERFORMANCE DAL PARTO ALLO SVEZZAMENTO... p. 103
- Massacci F.R., Cucco L., De Luca S., Felici C., Sebastiani C., Tentellini M.,  
Magistrali C.F.*  
DINAMICA DELL'INFEZIONE DA BRACHYSPIRA  
HYODYSENTERIAE IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DA  
INGRASSO ENDEMICAMENTE INFETTO ..... p. 107

- D'Incau M., Grassi A., Giovannini S., Salogni C., Zanoni M., Ruggeri J., Pasquali P., Alborali G.L.*  
**RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI SALMONELLA TYPHIMURIUM E DELLA SUA VARIANTE MONOFASICA ISOLATI DA SUINI IN ACCRESCIMENTO** ..... p. 115
- Salogni C., Lazzaro M., Giovannini S., Giuliani M., Giacomini E., Pasquali P., Alborali G.L.*  
**MYCOPLASMA HYORINIS, HAEMOPHILUS PARASUIS E CO-INFEZIONI BATTERICHE NELLE POLISIEROSITI DEL SUINO** ..... p. 121
- Baldo V., D'Incau M., Salogni C., Giovannini S., Rossi L., Acquarone F., Boniotti M.B., Pasquali P., Alborali G.L.*  
**CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE, TIPIZZAZIONE SIEROLOGICA E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGA TOSSINA (STEC) ISOLATI DA SUINI** ..... p. 125
- Luppi A., Bonilauri P., Maioli G., Gherpelli Y., Dottori M.*  
**RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN CEPPI DI STREPTOCOCCUS SUIS ISOLATI NEL SUINO NEL PERIODO 2004-2014** ..... p. 133
- Pozzi P., Etinger M., Gelman B., Pirogov V., Khinich E., Hadani Y.*  
**DESCRIZIONE CLINICA DI UN FOCOLAIO DI AFTA EPIZOOTICA IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO** ..... p. 139
- Vio D., Ustulin M., Targhetta C., Pierasco A., Toson M., Cocchi M., Tagliente D., Passera A., Conedera G.*  
**VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA I RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI DI FLUIDI ORALI E CAMPIONI DI SIERO NEL MONITORAGGIO DELLA PRRS IN SUINETTI SVEZZATI** ..... p. 147
- Foni E., Chiapponi C., Faccini S., Baioni L., Barbieri I., Rosignoli C., Merenda M., Zanni I., Manfredi R., Sandri G., Nigrelli A.D.*  
**SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS "INFLUENZA D" IN SUINI DI ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA** ..... p. 151
- Barbieri I., Faccini S., Boniotti M.B., Alborali G.L., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A.*  
**CIRCOLAZIONE DI PCV2 IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA: VERSO UN NUOVO SHIFT GENETICO?** ..... p. 157
- Giacomini E., Lazzaro M., Boniotti M.B., Scali F., Pasquali P., Amadori M., Ruggeri J., Bardini R., Gamba F., Leotti G., Ana M., Alborali G.L.*  
**MONITORAGGIO DEI PRRSV E SIV IN SUINI SVEZZATI MEDIANTE L'USO DI FLUIDI ORALI** ..... p. 165

## POSTERS

*Bekaert S., Mazzoni C., Leone M., Amorico A., Mondin P., Festi G.*  
INFERTILITÀ ESTIVA: EFFETTO DI UN MANGIME COMPLE-  
MENTARE (LIANOL FERTI®) SOMMINISTRATO ALLE SCROFE  
NEL PERI-SVEZZAMENTO ..... p. 173

*Ortolan T., Tonon F., Mencarelli A., Pappaterra G.*  
EFFETTO DELL'INDUZIONE DEL PARTO CON D-CLO-  
PROSTENOLO (VETEGLAN®) SULLE PERFORMANCE DI  
SCROFA E NIDIATA ..... p. 177

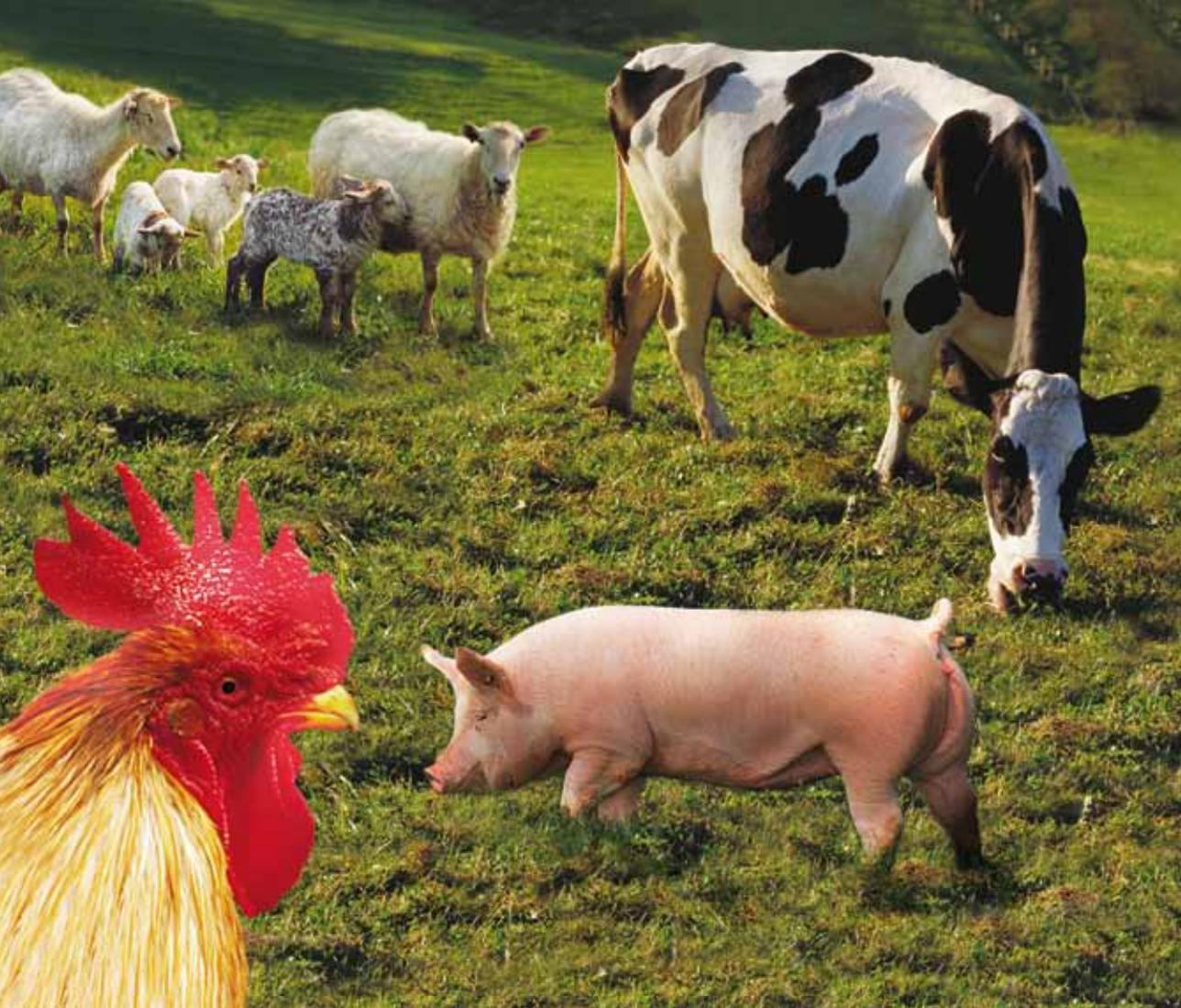
*Rossi R., Maghin F., Tucci T., Corino C.*  
MISCELA DI ESTRATTI NATURALI (ALGATAN MATER®)  
NELLA DIETA DI SCROFE IN LATTAZIONE: EFFETTI SU  
PERFORMANCE DI SCROFE E SUINETTI ..... p. 183

## PREMIO GUADAGNINI 2016

*Balzani A., Cordell H. J., Edwards S. A.*  
MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DELLA MAMMELLA  
NELLA SCROFA AL FINE DI IMPLEMENTARE LA  
SOPRAVVIVENZA E LE PERFORMANCE DEI SUINETTI ..... p. 193

## PREMIO GIOVANE LAUREATO 2016

*De Lucia A., Bianco C., Ostanello F., Avallone G., Nannoni E., Sarli G.*  
DENSITÀ DI PLASMACELLE NELLE VIE GENITALI DI  
SCROFETTE ..... p. 207



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

 **NUMEROVERDE**  
**800-015121**

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



# La gestione completa della PRRS in tutto l'allevamento

Studiata per le scrofe e scrofette

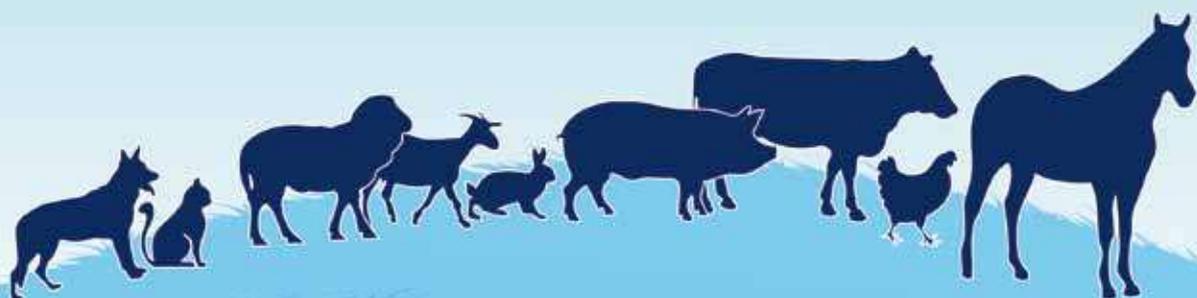
Studiata per i suinetti





**CALIER**

*Committed to animal welfare*



UN'IMPRESA DEL **GRUPPO INDUKERN**



# cevolution

Iniettiamo progresso



L'evoluzione dell' antibioticoterapia



*Il tuo partner in  
Terapia Veterinaria  
e Nutrizione Animale*



Distributore esclusivo per l'Italia



*Italian pharmaceutical  
company since 1976*



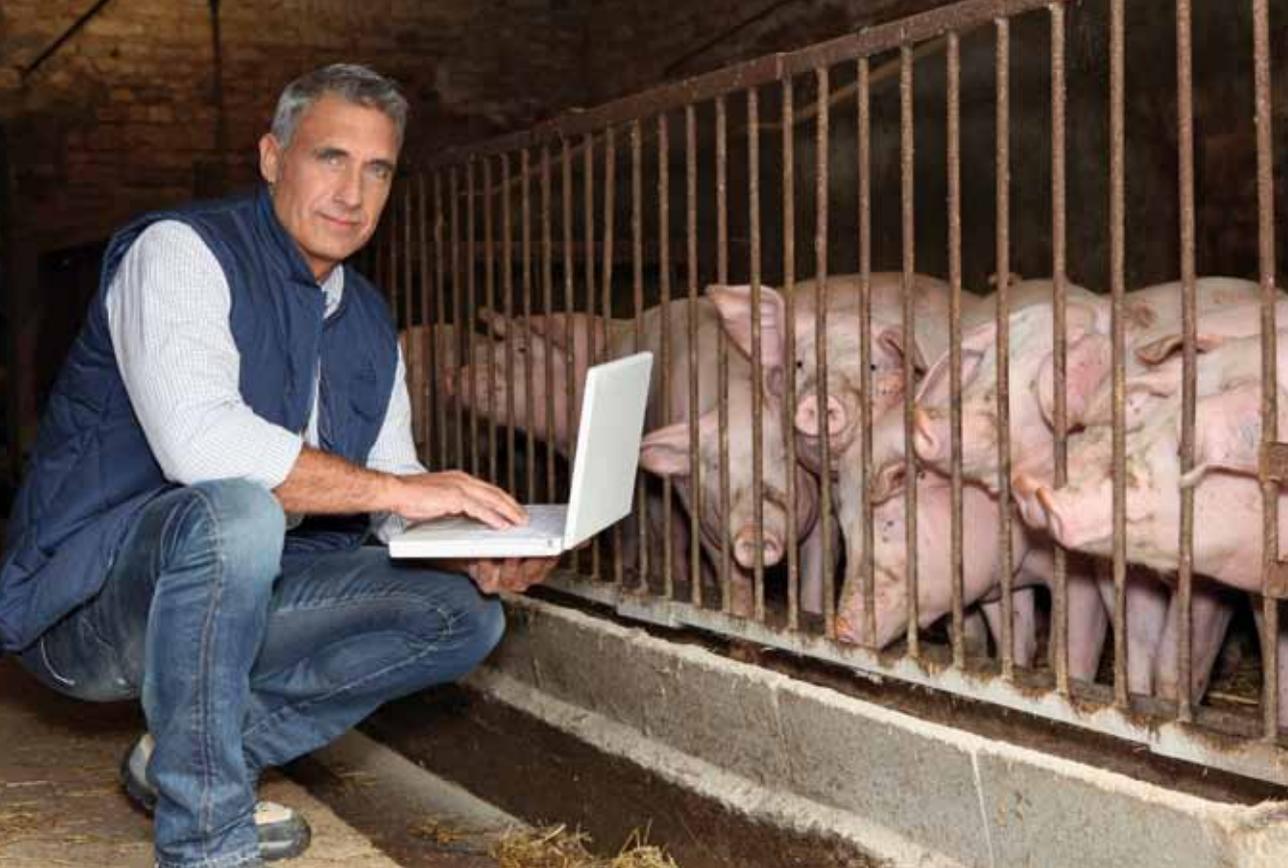


# Dechra

Veterinary Products

**Dechra Veterinary Products srl**  
**Via Agostino da Montefeltro, 2**  
**10134 - Torino**

**[www.dechra.com](http://www.dechra.com)**



## Sicuro tu, sani i tuoi animali.

Sappiamo curare una malattia anche prima che si manifesti. Perché conosciamo l'importanza dell'alimentazione e della prevenzione. Una competenza unica, che ci permette di sviluppare prodotti farmaceutici efficaci. E sappiamo anche quando serve davvero di usarli.

*Avere cura è molto più che curare.*

### **You're safe and your animals are healthy.**

We know how to treat an illness even before it emerges. That's because we know the importance of nutrition and prevention. Our unique expertise allows us to develop effective pharmaceutical products. And we also know when they are truly necessary.

*We do more than cure, we take care.*

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





# Innovazione e Ricerca al servizio della produzione animale



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

## PREFAZIONE

Cari Amici,

è con vero piacere che ho accettato il compito, assegnatomi dal Presidente, di introdurvi al quarantaduesimo congresso annuale, soprattutto perché si tratta di una sorta di congedo dopo sei anni trascorsi nel Consiglio Direttivo della Società ed è quindi anche tempo di bilanci.

Mi sono avvicinato alla SIPAS alla fine degli anni '90 da timido giovane laureato, portando il mio primo lavoro scientifico e tra le incertezze della prima volta non fu un "bagno di folla", ma capii che la SIPAS poteva essere un'opportunità per crescere professionalmente e con il passare del tempo così è stato. In quegli anni la SIPAS si presentava vigorosa, quasi spavalda.

Oggi, non più così giovane e non più così timido, vedo la SIPAS un pò affaticata e segnata dal trascorrere del tempo e dal particolare momento storico che stiamo vivendo. Mi piace pensare che il futuro della SIPAS possa essere ancora molto lungo, alimentato dall'attaccamento dei soci e dalla loro attiva partecipazione, condizione essenziale per renderla viva e vitale.

Mi dispiace, al contrario, dover parlare di crisi della suinicoltura italiana, ma purtroppo questo è un dato di fatto, ed il profondo cambiamento a cui è andato incontro questo settore nel corso degli anni ha connotati drammatici. E' vero, le condizioni di mercato continuano a penalizzarci e a queste si devono aggiungere le problematiche sanitarie, che il Medico Veterinario operante nel comparto suinicolo deve affrontare senza dimenticare gli aspetti economici-finanziari che gravano sull'azienda. In questo particolare momento storico, tuttavia, la SIPAS ha sicuramente il compito di lavorare per organizzare incontri di aggiornamento. Questi devono essere mirati a fornire ai Soci quelle informazioni che siano d'aiuto nell'affrontare, con maggiore forza, i problemi che incontrano durante lo svolgimento della loro attività.

E i giovani colleghi?

Sì, perché se da una parte la crisi economica ha investito la suinicoltura, certamente non ha risparmiato i giovani colleghi, molti dei quali molto preparati, intraprendenti e assolutamente meritevoli di veder realizzate le loro aspettative professionali. In questo senso la SIPAS si è già prodigata e dovrà continuare a creare delle opportunità in senso formativo, come ha recentemente realizzato attraverso la creazione di borse di studio, appunto per giovani laureati.

Ma veniamo al Meeting annuale. Questo ha sempre rappresentato un evento a cui non mancare e si può affermare che la frase "oh ci vediamo alla SIPAS" è diventata quasi una parola d'ordine o una promessa. Proprio così, perché i meeting SIPAS e in particolare quello annuale hanno sempre rappresentato un momento molto importante di incontro e di condivisione, dando il via a collaborazioni, nuove idee e progetti futuri.

Il volume degli atti, che come sempre accompagna lo svolgimento del congresso, comprende i testi relativi agli argomenti che verranno trattati in questi due giorni durante il Meeting, ma anche quelli che hanno caratterizzato la giornata autunnale di Ottobre 2015 tenutasi a Parma e dedicata ad un tema di grande attualità come la PED. Questo è completato dalle comunicazioni scientifiche inviate dai soci, che riguardano argomenti di attuale interesse. La produzione scientifica inviata dai Soci assume grande importanza

ed è il segno della vivacità e della partecipazione alla vita della Società da parte dei Soci stessi. In tale contesto si dovrebbe concretizzare la produzione del presente volume, dove i lavori scientifici presentati dovrebbero andare a disegnare un percorso di ricerche, osservazioni e risultati che rappresentano le tendenze e le necessità scientifiche di un determinato momento storico.

Solo attraverso questo processo e dal continuo confronto, aperto alla discussione, si può ambire ad una costante crescita professionale e ad un ampliamento delle conoscenze.

Un ringraziamento particolare va ai colleghi del Consiglio Direttivo con i quali ho condiviso questi ultimi 6 anni e con cui si è cercato, attraverso un costante impegno, di lavorare in sintonia con le aspettative dei soci e per la Società. Forse non sempre ci siamo riusciti e qualche errore è sicuramente stato commesso, ma si sa che, per usare un esempio calcistico, “i rigori li sbaglia solo chi prova a tirarli”.

Un ringraziamento sincero va alla Segreteria Delegata, in particolare a Pietro e Giorgia Montanari per la professionalità e la disponibilità dimostrata e per la faticosa collaborazione.

Un doveroso ringraziamento va agli Sponsor che in questi anni hanno generosamente supportato la SIPAS.

Ultimo, ma non per importanza, va un saluto ed un ringraziamento a tutti i Soci e l’augurio di una proficua lettura di questo volume degli atti.

Il segretario  
Dr. Andrea Luppi





ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**“EVOLUZIONE E TENDENZE  
DEI MERCATI INTERNAZIONALI E IMPATTO  
DELLE MALATTIE: IL CASO PED”**

*Parma, 9 Ottobre 2015*



# **DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO, L'ESPERIENZA DEGLI STATI UNITI**

SNELSON H.

*DVM, American Association of Swine Veterinarians*

La diarrea epidemica del suino (PED) è una malattia virale causata da un membro della famiglia Coronaviridae (virus della diarrea epidemica del suino, PEDV). Nonostante le manifestazioni cliniche siano simili a quelle della gastroenterite trasmissibile (TGE), PEDV non è correlato a TGEV. Infatti, la vaccinazione preventiva per TGEV (o, presumibilmente, una precedente esposizione a TGEV o coronavirus respiratorio), non induce protezione nei confronti di PEDV. L'introduzione di PEDV in un allevamento naïve si traduce in focolai acuti, caratterizzati da diarrea grave, vomito, elevata morbilità (spesso 100%) e mortalità variabile (fino al 100% nei suinetti). Il periodo di incubazione è breve (2 - 4 giorni) e l'immunità naturale si sviluppa nel corso di due o tre settimane, con conseguente protezione colostrale per i suinetti neonati. Il virus si diffonde per via feco-orale e attraverso fomiti.

La diagnosi si basa sulla sintomatologia clinica, l'annesi, la positività in ELISA o in microscopia elettronica delle feci, l'analisi in PCR e l'esame post-mortem. L'isolamento virale risulta particolarmente indaginoso. La diagnosi differenziale da TGE richiede una diagnosi di laboratorio. La terapia è solo di supporto, per mantenere l'idratazione. Per la prevenzione dell'infezione sono stati sviluppati diversi vaccini commerciali, che sono efficaci nel creare un booster di un'immunità esistente, dovuta ad una precedente infezione, ma meno efficaci nello stimolare un'immunità in animali naïve.

Il virus è sensibile a molti dei comuni disinfettanti, compresi: Virkon S, Clorox, 1 Stroke Environ e Tek-Trol (Pospischil A, et al; 2002). La sanificazione e l'asciugatura dei camion di trasporto sono efficaci contro PEDV. Risultati preliminari suggeriscono che sia possibile inattivare PEDV anche in presenza di feci riscaldando i camion a 160°F per 10 minuti oppure mantenendoli a temperatura ambiente (68°F) per almeno 7 giorni (Holtkamp; 2014).

La malattia è stata identificata per la prima volta in Europa nel 1971 in Gran Bretagna, ed è diventata endemica anche in Asia nel 1982. Nel 2010, è stata identificata una variante del virus PED in allevamenti di suini in Cina, con una diminuzione dell'efficacia dei comuni vaccini utilizzati, con un conseguente aumento di morbilità e mortalità.

PEDV è stato identificato per la prima volta negli Stati Uniti a metà maggio 2013. L'analisi retrospettiva di campioni di feci ha dimostrato che il virus era presente negli Stati Uniti fin da metà aprile. Il virus attualmente circolante negli allevamenti suini degli Stati Uniti ha un'omologia del 99,4% con il ceppo circolante in Cina nel 2012.

Non è ancora chiaro come il virus sia stato introdotto negli allevamenti degli Stati Uniti. La prima introduzione sembra essere avvenuta in diversi siti non collegati, e in più Stati in un periodo relativamente breve di tempo. Le indagini iniziali hanno indicato una probabile associazione con ingredienti presenti in mangimi importati, anche se non è stata identificata nessuna fonte specifica. Una recente valutazione condotta dal USDA ha implicato come un probabili colpevoli imballaggi contaminati (borse) utilizzati per contenere grandi quantità di ingredienti. Ulteriori studi hanno identificato i trasporti e i punti di maggior concentrazione di suini (mercati, stalle di sosta, ecc) come siti chiave di contaminazione da virus e quindi come principali vie di esposizione per allevamenti naïve. È stato inoltre dimostrato che per ogni camion contaminato che arriva al macello, escono 1,7 camion contaminati (Lowe, 2013).

La stretta applicazione delle misure di biosicurezza volte a prevenire l'esposizione a fomiti

contaminati può contribuire a ridurre il rischio di trasmissione dell'infezione. Infatti, i gruppi di lavoro sulla PED hanno pubblicato raccomandazioni al fine di migliorare le misure di biosicurezza connesse a mercati, stalle di sosta e mezzi di trasporto. Il National Pork Board ha inoltre stanziato più di un milione di dollari per condurre una ricerca completa sui vari aspetti della PEDV.

PED non è una delle malattie elencate nella lista della Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE); non è considerata una malattia esotica negli Stati Uniti; e attualmente non ci sono restrizioni commerciali interstatali relative alla PEDV negli USA. Inoltre non è una zoonosi, non è di interesse pubblico, e non è un problema di sicurezza alimentare. Ciononostante, l'importanza economica dell'introduzione della malattia è risultata significativa. Si stima che ad oggi l'epidemia abbia coinvolto circa il 50% degli allevamenti suini degli Stati Uniti con un conseguente calo del 3% degli animali sul mercato nel 2014. Il mercato degli Stati Uniti conta, in media, circa 110 milioni di suini all'anno. Le scrofaie sono quelle che, se infettate, subiscono i maggiori danni, sperimentando significative perdite di suinetti per un periodo prolungato. In media, servono infatti circa 7 settimane per un allevamento di scrofe infetto per tornare alla produttività normale.

Quei produttori che non sono stati toccati dall'infezione, hanno fatto guadagni record. Nel complesso, gli utili degli allevatori statunitensi hanno compensato le perdite, risultando nel complesso, in un generale profitto per l'industria suina nel 2014. Viceversa macelli, stabilimenti di trasformazione e dettatglianti hanno tutti subito gravi perdite dovute alla minor produzione di carne suina e al conseguente aumento dei prezzi (Schulz e Tonsor, 2015).

L'introduzione del virus della PED ha mostrato la vulnerabilità del settore suinicolo degli Stati Uniti riguardo il rischio di importazione di malattie. Se da una parte produttori, veterinari, ricercatori e governo erano a conoscenza della circolazione del virus nel sud-est asiatico almeno dal 2012, nessuno di loro era in grado di far fronte a una possibile introduzione negli Stati Uniti. Per questo motivo, è stato realizzato il Swine Health Information Center (SHIC). Il centro è finanziato dagli allevatori statunitensi per monitorare i virus suini a livello globale e per accorpare le ricerche tese a prevenire e gestire le eventuali introduzioni di malattie emergenti.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. E.J. Neumann, A. Ramirez, and K.J. Schwartz; Porcine Epidemic Diarrhea; *Swine Disease Manual*, 4<sup>th</sup> Ed.; Chapter 56, p.141
2. Li W, Li H, Liu Y, Pan Y, Deng F, Song Y, et al; New variants of porcine epidemic diarrhea virus, China, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2012 Aug. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1808.120002>  
DOI: 10.3201/eid1808.120002
3. Lowe, Jim; Harvest Plant Contamination Study
4. Holtkamp, Derald; Evaluation of time and temperature sufficient to kill PEDV in swine feces on metal surfaces; Proceedings of the 23rd IPVS Congress, Cancun, Mexico – June 8-11, 2014
5. Pospischil A, Stuedli A, Kiupel M, et al; Update on porcine epidemic diarrhea. *J Swine Health Prod.*2002;10(2):81–85
6. Song D, Park B; Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines; *Virus Genes.* 2012 Apr;44(2):167-75. doi: 10.1007/s11262-012-0713-1
7. Schulz, Lee and Tonsor, Glynn; Assessment of the economic impacts of porcine epidemic diarrhea virus in the United States; Journal of Animal Science Accepted paper, posted 8/24/2015
8. Swine Health Information Center, [www.swinehealth.org](http://www.swinehealth.org)
9. Turner, Matthew; NC Buying Station Survey; 2013 July 3
10. USDA APHIS; SECD Root Cause Investigation Report; 2015 September 24.

# **DIARREA EPIDEMICA DEL SUINO (PED), LA PROSPETTIVA CANADESE**

MÉNARD J.

*F. Ménard inc., Ange-Gardien, Québec, Canada. [jmenard@fmenard.com](mailto:jmenard@fmenard.com)*

## **INTRODUZIONE**

La diarrea epidemica del suino (PED) è una malattia diffusa e presente in molti paesi del mondo. Identificata per la prima volta in Asia oltre 10 anni fa, è stata introdotta negli Stati Uniti nel maggio 2013. Sono stati colpiti contemporaneamente diversi Stati e diverse tipologie di allevamento e, apparentemente, i focolai non avevano alcuna connessione tra loro. Il ceppo PEDV che è stato isolato è risultato geneticamente correlato ad un ceppo cinese identificato nel 2012. La causa dell'introduzione iniziale in America non è stata identificata con certezza, ma alcuni ingredienti dei mangimi sono risultati i più probabili sospetti.

I veterinari statunitensi hanno descritto una straordinaria capacità di diffusione di PEDV tra allevamenti diversi da maggio 2013 all'autunno dello stesso anno. I suinetti sottoscrofa presentavano diarrea acquosa profusa e vomito; entro 24 - 48 ore, la morbilità era del 100%. La mortalità per un periodo di sei settimane era del 100%. I segni clinici descritti erano simili a quelli della TGE (2). Nel dicembre del 2013, più di 20 stati diversi avevano avuto casi di PED, il 40% della scrofaie statunitensi sono state infettate e sono stati confermati più di 1.500 casi.

Per il Canada, dati gli intensi scambi commerciali di scrofe e suinetti svezzati con gli USA, il rischio di trasmissione è stato da subito molto elevato.

## **UN PO' DI STORIA**

I primi due casi di PED sono stati registrati in Canada in gennaio 2014, contemporaneamente: uno in allevamento a ciclo chiuso in Ontario e l'altro in Quebec. La minaccia di diffusione dell'infezione era reale. In 20 giorni, 11 allevamenti si sono infettati da PEDV, la maggior parte era situata in Ontario.

L'unica correlazione tra questi allevamenti era l'utilizzo di proteine plasmatiche, risultate poi positive in PCR per PEDV e utilizzate nella preparazione del creep feed e l'uso di questo mangime in tutte le aziende contemporaneamente (4, 6).

Per F. Menard, una società di produzione integrata in Quebec che produce più di 1 milione di suini all'anno, evitare l'introduzione di PEDV era una priorità. Il 10 febbraio 2014 è stato rilevato un primo campione positivo in PCR nella zona di carico di un nostro macello. Secondo i registri, 17 allevamenti diversi avevano consegnato suini al macello quella mattina. I campioni prelevati da questi allevamenti hanno permesso di identificare il sito di magronaggio-ingrasso come quello contaminato. Il gruppo di suini positivo in PCR non aveva mai mostrato alcun segno clinico. La fonte di introduzione del virus è stata identificata nel trasportatore, che non ha seguito le norme di biosicurezza, in particolare non lavando in modo adeguato il suo camion dopo essere stato nell'impianto di macellazione contaminato, in una stagione con temperature molto basse, e venendo in uno dei nostri allevamenti utilizzando gli stessi stivali sporchi usati al macello il giorno prima. Il nostro allevatore ha poi lui stesso veicolato il virus utilizzando gli stessi stivali e vestiti di quelli usati nel sito infetto.

## **LA FINE DELLA STORIA**

Il supervisore della F. Menard che ha visitato quel cliente specifico è stato anche in visita a più di 50 altri clienti ogni due settimane. Da quanto ci risulta, l'allevamento era già infetto

da un mese prima che venisse identificata la positività per PEDv. Il supervisore non ha però veicolato l'infezione a nessuna delle altre 50 stalle, perché ha semplicemente seguito le regole di biosicurezza di base: cambio di stivali, tute e guanti tra aziende, applicazione norme igieniche. La lezione appresa: una buona biosicurezza può prevenire la trasmissione di PEDv. Questo primo caso è stato risolto applicando rigide misure di biosicurezza e severe norme igienico-sanitarie. PEDv si è confermato altamente resistente nell'ambiente, dato che sono risultati positivi i campioni prelevati all'ingresso dell'allevamento, nelle crepe dei muri dei box, sugli stivali dell'allevatore e anche all'esterno dei capannoni. Il capannone positivo è stato mantenuto vuoto per 3 mesi prima di introdurre un nuovo gruppo di suini, che è rimasto negativo dopo l'introduzione.

### **COSA POTEVAMO MIGLIORARE ALLA F. MÉNARD?**

L'obiettivo finale di F. Menard è sempre stato quello di evitare l'introduzione dell'infezione negli allevamenti di riproduttori. L'impatto economico dell'introduzione di PEDv in un allevamento è drammatico, con una perdita media di 2.500 suinetti per 1.000 scrofe e 7.4 settimane prima di tornare all'80% della produzione originale (5). La struttura integrata di F. Ménard, collega tutte le unità di produzione, garantendo mangimi, autotrasporti, gestione delle deiezioni e impianti di macellazione, e questi collegamenti possono avere un impatto devastante sulla diffusione delle malattie. Qualunque reparto scrofe o ingrasso infetto da PEDv può avere un effetto a cascata su tutto il nostro sistema, portando a gravi perdite economiche.

### **AZIONI INTRAPRESE PER PREVENIRE LA PED**

#### **Dieta**

Da febbraio 2014, nono sono più state utilizzate proteine di origine suina nei nostri mangimifici. È stato interrotto l'utilizzo di plasma e farine di sangue nelle formulazioni dei mangimi.

#### **Trasporti**

I camion sono dedicati per ogni fase della produzione. Il rischio è stato frammentato utilizzando camion diversi (camion per scrofette e allevamento nucleo, camion per suinetti svezzati e camion per ingrassi) e mantenendoli in 3 differenti garage riscaldati. I camion vengono lavati, disinfettati e asciugati ogni sera dopo il turno del conducente.

Inoltre sono anche stati fatti corsi di formazione ai trasportatori riguardo le norme di biosicurezza al fine di prevenire l'introduzione di PEDv negli allevamenti.

#### **Allevamenti**

Attualmente stiamo operando in più siti di produzione. Abbiamo diverse squadre che si occupano specificamente di scrofaie, svezzamenti, e ingrassi. Vengono applicate severe norme di biosicurezza negli allevamenti: doccia in entrata e in uscita, cambio degli indumenti, registrazione dei visitatori. Tutti i materiali introdotti in allevamento devono essere disinfettati e riscaldati per 24 ore prima di essere introdotti. Non è ammessa l'introduzione di telefoni cellulari e cibarie all'interno di capannoni. Le scrofaie sono dotate di proprie banchine di carico impedendo l'eventuale introduzione di trasporti dall'esterno e quindi limitando il rischio di diffusione della malattia.

#### **Monitoraggio**

Pensiamo che la prevenzione attraverso una applicazione intensiva della diagnostica sia essenziale per il controllo della PED. Più velocemente vengono rilevate le nuove infezioni, più alto è il tasso di successo nell'eliminare il virus. Da gennaio 2014, i campioni vengono sistematicamente prelevati nei punti più a rischio: piattaforme di carico, suini prima della macellazione, scrofette prima e dopo il trasporto, camion e area di disinfezione e lavaggio.

Questo intenso piano di monitoraggio ci ha dato la possibilità di intervenire molto rapidamente e prevenire la diffusione della malattia.

### NUOVI CASI NEL 2015

La stagione estiva ha dato un po' di sollievo all'incidenza dell'infezione in Canada, ma con l'abbassarsi delle temperature, l'infezione da PEDv è tornata con forza. Ancora una volta nel giro di due settimane, tre grossi allevamenti sono stati infettati e il virus si è diffuso molto rapidamente tra i diversi capannoni in ogni sito. L'introduzione del virus è avvenuta di nuovo attraverso il trasporto di suinetti in entrata ed è stato poi diffuso a più di 20.000 suini per la mancata applicazione delle norme di biosicurezza. Questi nuovi focolai hanno coinvolto 22 diversi allevamenti e hanno mostrato come PEDv può diffondersi rapidamente e contaminare con facilità l'ambiente. La tabella 1 mostra ogni campionamento ambientale risultato positivo in PCR nei diversi allevamenti.

**Tabella 1 – Campionamenti ambientali positivi per PED in PCR**

|                           |     |                                 |    |
|---------------------------|-----|---------------------------------|----|
| Fossa di raccolta liquami | +++ | Area di carico dell'allevamento | ++ |
| Pavimentazione            | +++ | Camion                          | ++ |
| Pareti box                | ++  | Idropulitrice                   | ++ |
| Uffici                    | +   | Area di carico macello          | +  |
| Ingresso capannoni        | +   | Zona lavaggio camion            | +  |
| Esterno capannoni         | +   |                                 | +  |

### LE LEZIONI APPRESE

Questo virus è altamente contagioso, è molto resistente nell'ambiente e quindi la pulizia è il principale fattore di controllo. I diversi fattori di rischio per l'introduzione di PEDv sono:

1. Mangimi: l'esperienza di Stati Uniti e Ontario mostra come le proteine plasmatiche suine potrebbero aver introdotto PEDv negli allevamenti (1,4). Recenti ricerche hanno illustrato che alcuni ingredienti dei mangimi possono rappresentare buoni terreni di crescita per PEDv.
2. Trasporti: scarsa igiene, temperature basse, mancata applicazione delle norme di biosicurezza da parte dei trasportatori (3,4,7).
3. Allevatori: mancato rispetto delle norme di biosicurezza (cambio stivali, tute e guanti), spostandosi tra allevamenti diversi.
4. Attrezzature / riparazioni / visitatori: attrezzature sporche possono facilmente veicolare PEDv da un allevamento all'altro. Attenzione alle persone di servizio! (5).

### LA SITUAZIONE CANADESE

A marzo 2015, solo il 2% delle nostre scrofaie canadesi è risultato infetto, se confrontato con il 60% degli USA. Il 77% dei casi primari canadesi sono stati risolti con successo. In risposta al crescente numero di casi, in Canada sono stati creati diversi gruppi di esperti con lo scopo di aiutare i produttori nel controllo di questa nuova malattia. OSHAB (Ontario Swine Health Advisory Board) e EQSP (Equipe Québécoise de Santé suina) sono due organizzazioni a livello provinciale; CSHB (Canadian Swine Health Board) è il livello nazionale. Tutti i nuovi casi vengono dichiarati attraverso queste organizzazioni e vengono fornite le coordinate geografiche e specificato il tipo di produzione. Questi gruppi aiutano gli allevatori a pianificare l'eliminazione e a garantire il follow-up dell'infezione. Si occupano inoltre dei campionamenti ambientali presso macelli, impianti di trasformazione, lavaggi per camion, mangimifici, e di compilare e pubblicare regolarmente i risultati ottenuti. Inoltre forniscono

agli allevatori linee guida e procedure per l'eliminazione della PED e l'applicazione di adeguate misure di biosicurezza. L'obiettivo è quello di controllare ed eliminare PEDv in Canada.

### **I MIEI CONSIGLI ALLA COMUNITÀ EUROPEA**

Applicare un piano di sorveglianza diagnostica, in associazione alla stesura di procedure e SOP, concentrandosi su igienizzazione dei camion e norme di biosicurezza, è la base per prevenire un'ulteriore diffusione di questo virus. Se la malattia fosse notificabile sarebbe più facile il follow-up della trasmissione e il controllo della malattia.

### **IN CONCLUSIONE**

PED è stata ed è ancora una malattia da cui imparare. E ci ha mostrato quanto sia debole l'applicazione delle norme di biosicurezza in alcune parti del nostro sistema produttivo. Con questa malattia ogni dettaglio è importante ed un'eccellente igiene è un punto chiave per il controllo. Questa sfida ci aiuterà a controllare e prevenire altre malattie come la PRRS, che, con oltre il 60% delle scrofaie degli US infette, rappresenta ancora un gravoso problema.

### **RINGRAZIAMENTI**

Un grazie particolare ai nostri colleghi degli Stati Uniti e dei nostri vicini dell'Ontario per tutte le informazioni che hanno condiviso con noi. Abbiamo imparato molto da loro. Sappiamo cosa fare e cosa non fare.

Un ringraziamento speciale al team di produzione F. Ménard. Insieme stiamo lavorando ogni giorno per migliorare le misure di biosicurezza e prevenire la diffusione di questa costosa malattia.

### **BIBLIOGRAFIA**

1. Dee, S., Clement, T., Schelkopf, A., Nerem, J., Knudson, D., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. 2014. An evaluation of contaminated feed as a vehicle for porcine epidemic diarrhea of naïve pigs following consumption via natural feeding behavior: proof of concept. *BMV veterinary Research* 10:176.
2. Dufresne, L. 2014. Field experience with porcine epidemic diarrhea. AASV annual meeting, Dallas, Texas. 613-616.
3. Lowe, J., Gauger, P., Harmon, K., Shaug, J., Connor, J., Yeske, P., Loula, T., Levis, I., Dufresne, L., Main, R. 2014. Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection. *Emerging infectious disease*; 20 (5) : 872-874
4. MacDougald, D. 2014. People and trucks – Keeping PED out of Midwest US and Canada. AASV annual meeting. Dallas, Texas.
5. Morrison, R., Goede, D. 2014. Epidemiology and economic impact of PED. AASV annual meeting. Dallas, Texas. 605-611.
6. Pasick, J., Berhane, Y., Ojkic, D., Maxie, G., Embury-Hyatt, C., Swekla, K., Handel, K., Fairles, J., Alexandersen, S. 2014. Investigation into the role of potentially contaminated feed as a source of the first detected outbreaks of porcine epidemic diarrhea in Canada. *Transboundary and Emerging Disease*. 61: 397-410.
7. Poulain, M.C., Moreau, I., Klopfenstein, C. 2014. La DEP, l'expérience américaine dans les systèmes de production les moins affectés. *Le Porcshow*. Québec, Canada.

# AGGIORNAMENTI SULLA SITUAZIONE DELLA PED IN ITALIA

GIACOMINI E.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna, Brescia*

**Parole chiave:** PED, diagnosi, coronavirus

**Key words:** PED, diagnosis, coronavirus

## INTRODUZIONE

La prima segnalazione del virus della (Porcine Epidemic Diarrhoea = PED) in Europa è avvenuta nel Regno Unito nel 1971 e in seguito in altri Paesi Europei durante gli anni '80. Nel decennio successivo l'incidenza della malattia si è ridotta e non ci sono state altre segnalazioni di episodi importanti ad andamento altamente diffusivo, con la sola esclusione dell'epidemia nel nostro Paese del 2005-2006 (1). A partire dal 2010 numerosi focolai gravi sono stati descritti in Cina e nel 2013 lo stesso ceppo si è diffuso negli Stati Uniti causando la morte di 7 milioni di suini nel primo anno di diffusione e perdite economiche molto importanti. Sempre negli Stati Uniti, nel 2014 si è avuta la diffusione di un secondo ceppo (S-INDEL) ritenuto a bassa patogenicità e di un altro coronavirus (Delta Coronavirus, PDCoV) che causa sintomatologia simile alla PED. Pur non essendo inclusa nella lista OIE delle malattie notificabili, le strategie adottate dall'Unione Europea (UE) per gestire la situazione PED e impedire l'introduzione di ceppi altamente virulenti segnalati in America, hanno perseguito il principio della massima precauzione. E' stato richiesto nel 2014 un parere scientifico all'EFSA (2), per la valutazione del rischio di potenziali vie d'ingresso di PEDV e PDCoV nell'Unione europea (UE). Questo parere raccomanda la messa a punto di nuovi strumenti diagnostici nei confronti del virus, l'acquisizione di maggiori conoscenze riguardo la sequenza genomica dei ceppi circolanti, l'implementazione di un monitoraggio per definire la sieroprevalenza nei diversi paesi, la realizzazione di prove sperimentali per ottenere maggiori conoscenze sulla patogenesi e la sintomatologia delle infezioni, l'esecuzione di indagini mirate a definire l'eventuale presenza di PDCoV e la definizione dell'importanza dei mangimi contenenti sangue e plasma essiccato di suino come fattore di rischio di introduzione e diffusione della infezione da PEDV. La Diarrea Epidemica del suino è una malattia virale causata da Coronavirus, la sintomatologia è prevalentemente enterica con diarrea liquida giallastra che colpisce tutte le classi d'età nell'allevamento suino, differenziandosi però sul tasso di mortalità che può raggiungere nei suinetti sottoscrofa e in svezzamento il 50-100% (3,4), mentre nei riproduttori e nei suini all'ingrasso è quasi nullo. La morbilità in tutte le età si attesta tra 80-100%.

Il virus viene facilmente inattivato con i comuni disinfettanti (5): formalina 1%, carbonato di sodio anidro 4% (soda), solventi dei lipidi, iodofori in acido fosforico 1%, idrossido di sodio 2% (soda caustica). PEDV sopravvive per tempi variabili fuori dall'ospite in funzione della presenza di materiale organico e delle condizioni di temperatura e umidità relativa: almeno 28gg nel fango a 4°C, 7gg in alimento secco contaminato da feci a 25°C, fino a 14gg a 25°C in alimento umido e almeno 28gg in miscele umide a 25°C. PEDV perde la propria infettività a T°>60°C ed è stabile a pH 6.5-7.5 a 37°C e pH 5-9 a 4°C. La principale via di trasmissione risulta essere quella oro-fecale con oggetti, attrezzature e veicoli contaminati da feci (2).

## SITUAZIONE DELLA PATOLOGIA NEI PRINCIPALI PAESI EUROPEI

Il virus in Europa ha iniziato a circolare nel maggio 2014 in Germania per poi diffondersi in altri Paesi, come riportato in tabella 1.

Tabella 1. PED in Europa

| PAESE      | Inizio Epidemia | PAESE   | Inizio Epidemia |
|------------|-----------------|---------|-----------------|
| Germania   | Maggio/'14      | Spagna  | 2015            |
| Ucraina    | Summer/'14      | Olanda  | 2015            |
| Francia    | Dicembre/'14    | Austria | 2015            |
| Slovenia   | Dicembre/'14    | Estonia | 2015            |
| Belgio     | Gennaio/'15     | Romania | 2015            |
| Portogallo | Gennaio/'15     |         |                 |

Nei focolai riscontrati in Germania è stato eseguito il sequenziamento genomico che ha rivelato una percentuale di identità genomica col ceppo PEDV OH851 (ceppo S-INDEL responsabile negli USA di focolai a moderata patogenicità) del 99,5%, mentre in tutti gli altri Paesi riportati in tabella il sequenziamento ha riscontrato un'identità genomica col virus GER/L00719/2014 (virus riscontrato in Germania nel 2014) del 99,9%, con la sola esclusione dell'Ucraina dove è viceversa stato identificato un ceppo PEDV riconducibile (99,8% identità nucleotidica) ai virus americani ad alta patogenicità Kansas29/2013 e Colorado30/2013 (6). La Francia in seguito ai focolai del 2014-'15 ha decretato l'obbligo di notifica per i focolai di PEDV altamente patogeni.

## SITUAZIONE DELLA PATOLOGIA IN ITALIA

In Italia la PED è presente dagli anni '90 e tra il 1994 e il 2000 il 14,2% di casi di enterite è risultato positivo a PED in microscopia elettronica. Tra maggio 2005 e giugno 2006 è stata segnalata l'ultima epidemia (1), con sintomi clinici paragonabili a tutti i focolai che si sono poi avuti nei vari Paesi Europei ossia diarrea liquida, vomito e riduzione dell'assunzione dell'alimento. I focolai segnalati in quegli anni sono riportati in tabella 2.

Tabella 2. Casistica osservata durante l'ultima epidemia di PED in Italia nel 2005-2006

| Tipologia aziendale | Numero di focolai |      |
|---------------------|-------------------|------|
|                     | 2005              | 2006 |
| Ciclo chiuso        | 5                 | 18   |
| Svezamento          | 2                 | 2    |
| Ingrasso            | 14                | 22   |

Tra il 2008 e il 2014 i casi di PED diagnosticati (ME, ELISA e PCR) sono stati 91 su un totale di 1778 campioni (5,12%) ed hanno coinvolto 64 differenti aziende. Nel luglio 2014 sono stati diagnosticati i primi 2 focolai nel Nord Italia in un'area ad alta densità suinicola (7) ma solo a partire da gennaio 2015 vi è stata una diffusione endemica della PED. Grazie ad una scheda anamnestica (figura 1) stilata in concerto con le varie sedi territoriali dell'Istituto

Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna si è proceduto ad acquisire i dati anagrafici e identificativi degli allevamenti sede di focolai, la percentuale di morbilità e mortalità riscontrata nel momento della visita e sono stati eseguiti prelievi di matrici biologiche (sangue e feci) per condurre esami di laboratorio al fine di avere la conferma diagnostica del focolaio e rilevare eventuali anticorpi nei confronti del virus.



**SCHEDA E PROTOCOLLO CAMPIONAMENTO FOCOLAI PED 2015**

TIMBRO AZIENDALE \_\_\_\_\_

CODIC ALLEVX \_\_\_\_\_ TEL ALLEVATORE \_\_\_\_\_

TIPOLOGIA ALLEVAMENTO: CC CA ING Altro \_\_\_\_\_

N° RIPRODUTTORI \_\_\_\_\_ N° SUINI \_\_\_\_\_ MACELLO CONSEGNA \_\_\_\_\_

VETERINARIO RESPONSABILE \_\_\_\_\_ TELEFONO \_\_\_\_\_

DATA INIZIO FOCOLAIO \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ SETTORE INIZIO SINTOMATOLOGIA..CAP. \_\_\_\_\_

ULTIMI DUE CARICHI: \_\_\_\_\_

1. CAP \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_\_ CAT ANIMALI / MANGIME / ALTRO \_\_\_\_\_

2. CAP \_\_\_\_\_ DATA \_\_\_\_\_ CAT ANIMALI / MANGIME / ALTRO \_\_\_\_\_

CARICO DEI SUINI: INTERNO \_\_\_\_\_ ESTERNO \_\_\_\_\_

DISINFETTANTE UTILIZZATO PER MEZZI DI TRASPORTO: \_\_\_\_\_

| CATEGORIA                | SINTOMATOLOGIA |    | ANIMALI SINTOMATICI CON DIARREA % |      |       |     | INAPPETENZA SI/NO |    | MORTALITA' % | NOTE |
|--------------------------|----------------|----|-----------------------------------|------|-------|-----|-------------------|----|--------------|------|
|                          | SI             | NO | 0-5                               | 6-20 | 21-50 | >50 | SI                | NO |              |      |
| FECONDAZIONE ARTIFICIALE |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| GESTAZIONE IN GABBIA     |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| GESTAZIONE IN BOX        |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| SCROFE IN SALA PARTO     |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| SUINETTI SOTTOSCROFA     |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| SVEZZAMENTO              |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| MAGRONAGGIO              |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |
| INGRASSO                 |                |    |                                   |      |       |     |                   |    |              |      |

Figura 1. Scheda anamnestica utilizzata per la raccolta di dati in sede di focolaio

La sintomatologia riscontrata in tutti i focolai è assolutamente sovrapponibile con gli altri casi avutosi negli anni precedenti nel nostro Paese ossia diarrea liquida, dimagrimento e cachessia associata talvolta ad un alto tasso di mortalità nei suinetti sottoscrofa; diarrea liquida, vomito, ipertermia, inappetenza e agalassia nelle scrofe; diarrea liquida e inappetenza nei suini in fase di svezzamento e diarrea liquida, vomito, ipertermia e riduzione dell'assunzione dell'alimento nei suini all'ingrasso. Di seguito si riportano alcune immagini prese durante un focolaio nei diversi settori dell'allevamento (Figure 2-4).

In un numero rappresentativo di aziende da riproduzione (18) è stata rilevata la mortalità nei suinetti sottoscrofa: la percentuale media è stata del 26%, con range tra 1% e 80%. Da notare la reinfezione a distanza di più di 4 mesi in 2 aziende (1 riproduzione e 1 ingrasso).

Figura 2. Diarrea liquida in box da ingrasso



Figura 3. Sintomatologia in scrofe in gestazione in gabbia



Figura 4. Sintomatologia in suinetti sottoscrofa



I focolai riscontrati da gennaio 2015 ad ottobre 2015 sono stati in totale 165. Suddividendoli in funzione dell'indirizzo produttivo delle aziende sono stati 10 in Riproduzione a ciclo chiuso, 59 in riproduzione a ciclo aperto e 96 in allevamenti da ingrasso. Suddividendo i casi per settimana dell'anno, notiamo che il virus si è diffuso velocemente arrivando a 21 focolai diagnosticati nella 14° settimana per poi decrescere progressivamente, (Grafico 1). L'area maggiormente colpita è stata la provincia di Brescia (Figura 5).

Grafico 1. Andamento temporale dei casi di PED osservati da gennaio a ottobre 2015

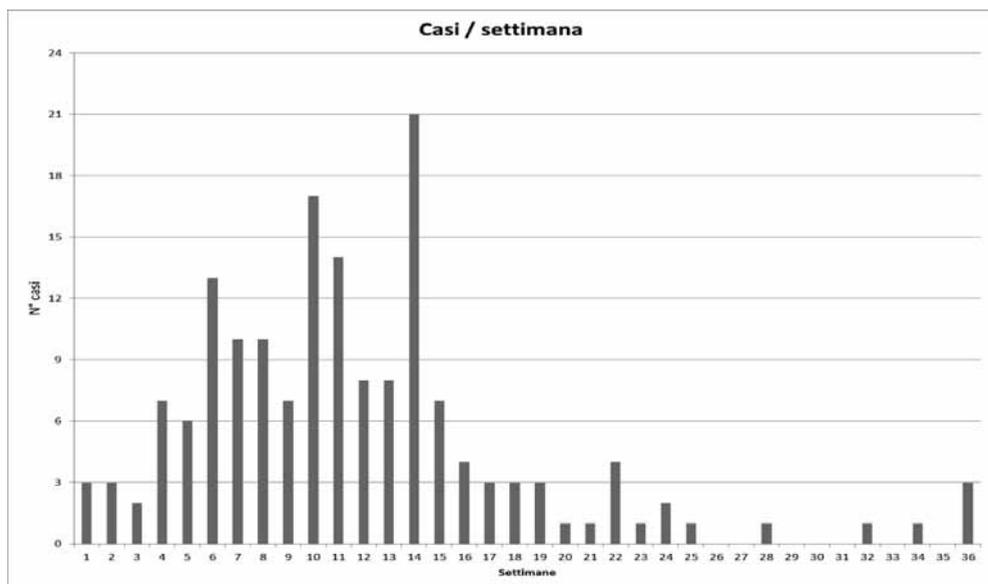
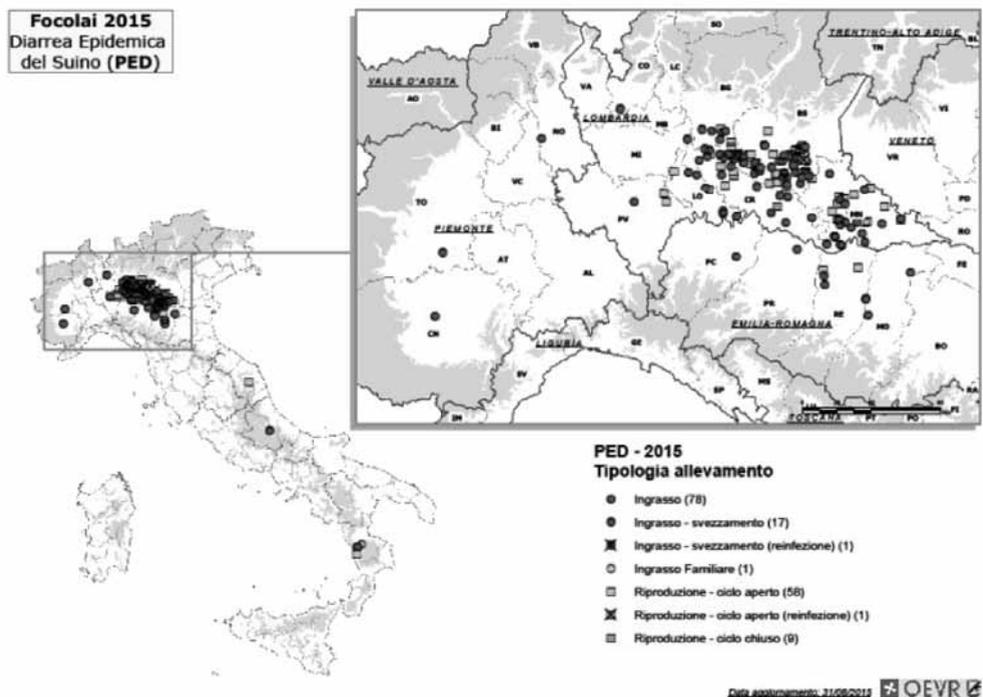


Figura 5. Mappa dei focolai di PED in Italia nel periodo gennaio-ottobre 2015



L'analisi della sequenza genomica completa eseguita su 8 campioni positivi rilevati in Italia dimostra una elevata percentuale di identità (>99%) con i ceppi circolanti in Germania, Francia, Belgio e in altri paesi europei nel 2014-2015 e con il ceppo USA OH851, ma una bassa identità con i virus circolanti tra il 2009 e il 2012 in Italia.

In conclusione si può affermare che il virus della PEDV è stato identificato maggiormente nell'area ad alta densità di suini nel Nord Italia. Tutti i 165 focolai diagnosticati hanno avuto una clinica ed un impatto sulla mandria simile, con sintomatologia classica rispetto alla malattia e causando una perdita a volte elevata di suinetti sottoscrofa. Negli animali in svezzamento invece è stata moderata. L'andamento del numero di focolai rispetto alla settimana/anno mostra un iniziale incremento per poi velocemente regredire, questo fenomeno potrebbe essere spiegato dal fatto che in molti allevamenti è stata condotta una diagnosi esclusivamente clinica senza avere una conferma diagnostica. Ne consegue che il numero di focolai reali rispetto a quelli riportati potrebbe essere superiore.

### STUDIO LONGITUDINALE

Lo studio, il cui scopo era di meglio capire la dinamica d'infezione della PED, si è svolto in 4 aziende da riproduzione a ciclo aperto che hanno avuto sintomatologia riferibile a PED. Nei 4 allevamenti si è dapprima proceduto al prelievo di feci da animali sintomatici per avere la conferma diagnostica. In ogni azienda sono state campionate 10 scrofe in sala parto e 30 suinetti, prendendone 3 per ogni scrofa. I suinetti sono stati identificati tramite marca auricolare e si è prelevato il sangue venoso e le feci tramite tampone rettale ogni 2-4 settimane. I campioni sono stati fatti pervenire mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica dell'IZSLER di Brescia. Le scrofe sono state campionate una sola volta al momento dell'inizio dello studio con prelievo di sangue venoso e feci. Il sangue è stato analizzato per la ricerca di anticorpi tramite kit ELISA mentre sulle feci è stata svolta la RT-PCR quantitativa (qRT-PCR). Lo studio ha avuto inizio in momenti differenti nei 4 focolai rispetto alla comparsa dei primi sintomi (infezione) e diverso è stato il settore inizialmente colpito. In tabella 3 vengono riassunti i dati delle 4 aziende.

Tabella 3. Dati riassuntivi delle aziende in cui è stato condotto lo studio longitudinale.

| Azienda | Settore comparsa sintomatologia | Settore inizio studio |
|---------|---------------------------------|-----------------------|
| 1       | Gestazione gabbia               | sala parto            |
| 2       | Ingrasso                        | sala parto            |
| 3       | Sala parto                      | sala parto            |
| 4       | Gestazione box                  | sala parto            |

### Scrofe

La percentuale delle scrofe che hanno mostrato un livello anticorpale nei confronti del virus varia dal 30% nell'allevamento numero 3 al 80% nell'allevamento numero 1. La percentuale delle scrofe positive a qRT-PCR varia da 70% nell'azienda numero 4 a 100% nella numero 2 e 3 mentre la media di copie genomiche per grammo di feci ottenuta tramite qRT-PCR ha un range tra 1,4E+06 e 2,00E+08 come riportato in tabella 4.

| Azienda | % Scrofe positive<br>AcELISA | % Scrofe positive<br>qRT-PCR | Media qRT-PCR<br>(copie genomiche/gr feci) |
|---------|------------------------------|------------------------------|--|
| 1       | 80                           | 80                           | 1,4E+06                                    |
| 2       | 50                           | 100                          | 2,00E+08                                   |
| 3       | 30                           | 100                          | 1,4E+08                                    |
| 4       | 33                           | 70                           | 1,9E+06                                    |

## Suinetti

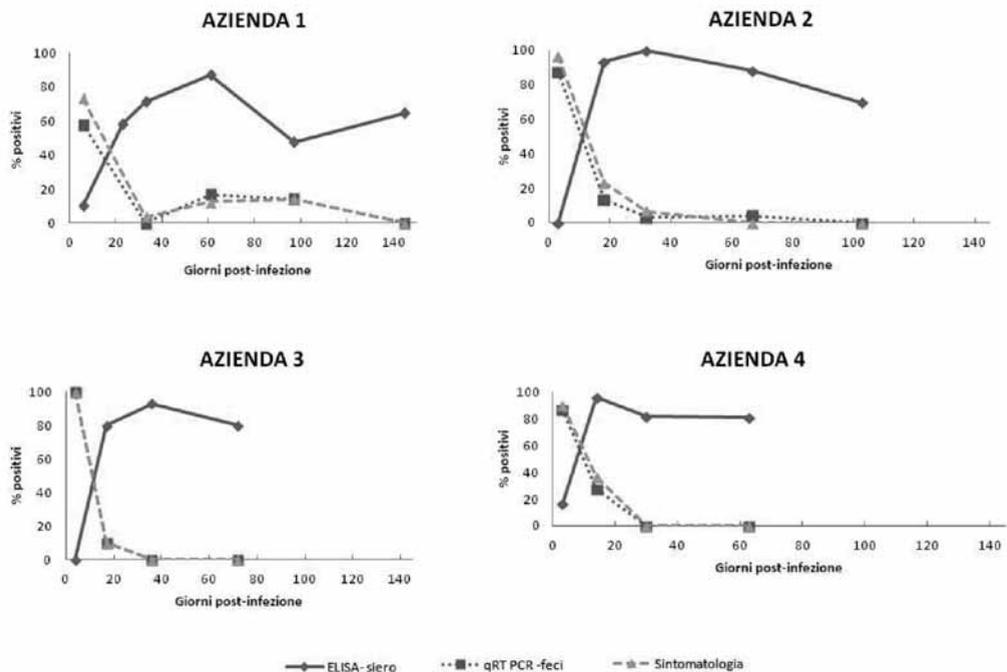
### Sierologia Ac ELISA

I campionamenti sono stati eseguiti per 145, 103, 72 e 63 giorni post-sintomatologia mentre nelle aziende 4 e 5 per 70 giorni circa. Il comportamento sierologico anticorpale degli animali del focolaio 3, 4 è sovrapponibile (Figura 6). A fronte di un rapido aumento della percentuale di animali sierologicamente positivi nei primi 20 giorni post-infezione, dopo circa 10 giorni, si assiste ad un lieve decremento. Diversamente nella prima azienda si è assistito ad un aumento di animali positivi nei primi 60 giorni post-infezione, un lieve decremento e un successivo nuovo aumento.

### qRT-PCR e sintomatologia

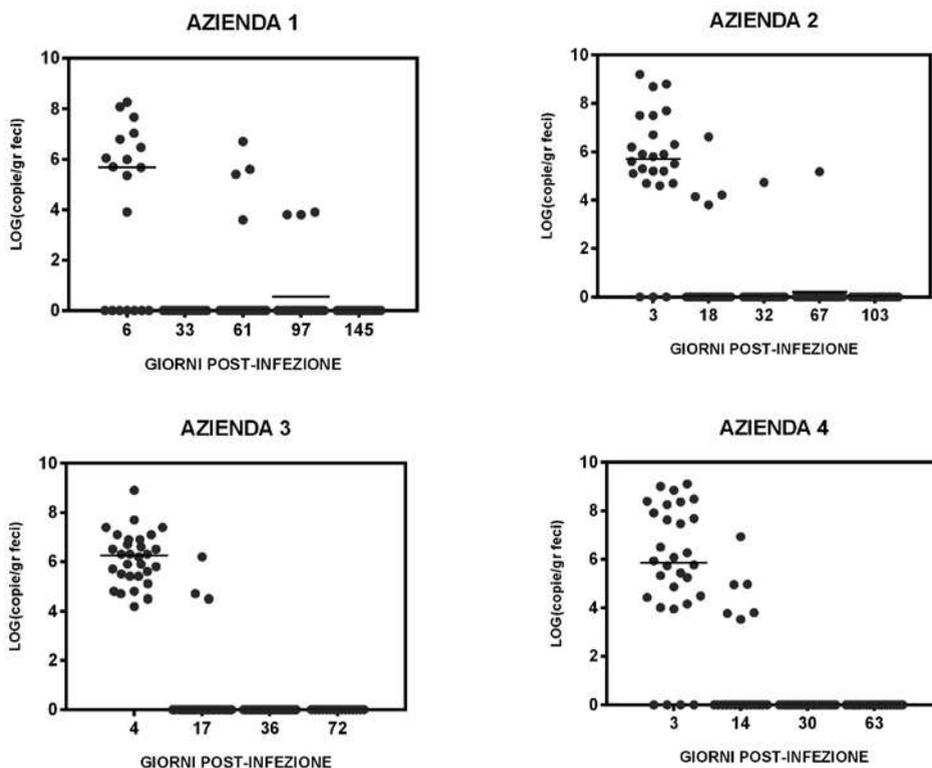
Gli animali percentualmente positivi in RT-PCR dalle feci e sintomatici hanno seguito una dinamica simile nei focolai 2,3 e 4 (Figura 6): la percentuale di animali positivi al primo campionamento è stata rispettivamente di 87.5, 100 e 86.7 per cento. Col procedere dei campionamenti si è notato una diminuzione degli animali positivi fino alla negatività osservata in media a 45 giorni dall'infezione. Nell'azienda numero 1 la percentuale di animali positivi è stata del 58%; in seguito ad un decremento del titolo virale a 33 giorni post-infezione tutti gli animali sono risultati negativi per poi assistere ad una riacutizzazione tra i 34 e 61 giorni post-infezione in cui si è registrato il 17% di positività. L'andamento della percentuale degli animali sintomatici nei 4 focolai ricalca la positività virale.

Figura 6. Suinetti; qRT-PCR vs sintomatologia vs sierologia Ac ELISA



La quantificazione delle copie genomiche su grammo di feci tramite qRT-PCR dimostra dei titoli alti vicino all'inizio dell'infezione per poi regredire col trascorrere del tempo come dimostrato nella Figura 7.

Figura 7. Suinetti; titoli in copie genomiche/gr di feci



In conclusione, tramite lo studio longitudinale in 4 aziende si sono evidenziate % di mortalità e % di positività al virus molto diverse. Il momento dell'entrata del virus nelle aziende rispetto al momento del parto, e quindi il grado di immunità delle scrofe e il livello di circolazione del virus, possono aver determinato la maggiore o minore gravità della PED in queste aziende.

### MONITORAGGIO MEZZI DI TRASPORTO

Il periodo di studio è stato tra gennaio e settembre 2015 ed ha coinvolto 4 impianti di macellazione situati nel Nord Italia. Presso il punto di scarico dei suini è stato eseguito sulla motrice del mezzo di trasporto un primo tamponamento ambientale (sporco) mentre un secondo (pulito) è stato ottenuto con le medesime procedure dopo l'avvenuto lavaggio e disinfezione dell'automezzo. I tamponamenti ambientali utilizzati sono costituiti da un manico in legno sulla cui estremità è fissata una garza assorbente.

I tamponamenti ("sporco" e "pulito") sono venuti a contatto con un metro quadrato di pavimentazione del pianale dell'automezzo. I campioni sono stati fatti pervenire mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica dell'IZSLER di Brescia. Le matrici sono state analizzate tramite qRT-PCR per la ricerca e quantificazione del virus.

I risultati qualitativi rivelano su un totale di 409 tamponamenti eseguiti, dei quali 213 sporchi e 196 puliti una percentuale di positività del 7,1%. I tamponamenti sporchi positivi sono stati 23 cioè il 10,8% mentre quelli puliti 6, ovvero il 3,1% come mostrato in tabella 5. I risultati quantitativi rivelano nei tamponamenti sporchi una media di copie genomiche/ml di  $6,46E+08$  mentre su quelli puliti  $6,99E+05$ .

## 5. Risultati del monitoraggio dei mezzi di trasporto

| Tamponi | Numero | Positivi | % Positività |
|---------|--------|----------|--------------|
| Sporco  | 213    | 23       | 10,8%        |
| Pulito  | 196    | 6        | 3,1%         |
| Totale  | 409    | 29       | 7,1%         |

Questo studio preliminare dimostra l'importanza dei mezzi di trasporto come fattore di rischio nella diffusione della Diarrea Epidemica del suino, sia come veicoli attivi se non adeguatamente sanificati sia come veicoli passivi nella movimentazione di suini infetti ed eliminatori tra un'azienda ed un'altra.

### BIBLIOGRAFIA

1. Martelli P., Lavazza A., Nigrelli A.D., Merialdi G., Alborali L.G. and Pensaert M.B., 2008. *Epidemic of diarrhoea caused by porcine epidemic diarrhoea virus in Italy*. Vet Rec. **Vol. 162** (issue 10); pag. 307-310.
2. Bøtner A., *EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare)*, 2014. *Scientific Opinion on porcine epidemic diarrhoea and emerging pig deltacoronavirus*. 2014, European Food Safety Authority.
3. Saif L.J., Pensaert M.B., Sestak K., Yeo S.G. and Jung K. 2012 *Coronaviruses in Diseases of Swine*, Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S. and Taylor D. (Eds) Blackwell: Oxford. pag. 501–524.
4. Stevenson G.W., Hoang H., Schwartz K.J., Burrough E.R., Sun D., Madson D., Cooper V.L., Pillatzki A., Gauger P., Schmitt B.J., Koster L.G., Killian M.L. and Yoon K.J., 2013. *Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences*. J Vet Diagn Invest. **Vol. 25** (issue 5); pag. 649-54.
5. Hofmann M. and Wyler R., 1989. *Quantitation, biological and physicochemical properties of cell culture-adapted porcine epidemic diarrhea coronavirus (PEDV)*. Vet Microbiol. **Vol. 20** (issue 2); pag. 131-142.
6. Dastjerdi A, Carr J, Ellis RJ, Steinbach F, Williamson S. 2015. *Porcine epidemic diarrhea virus among farmed pigs, Ukraine*. Emerg Infect Dis. **Vol. 21** (issue 12) pag. 2235-2237 <http://dx.doi.org/10.3201/eid2112.150272>
7. Boniotti M.B., Papetti A., Lavazza A., Alborali G., Sozzi E., Chiapponi C., Faccini S., Bonilauri P., Cordioli P., and Marthaler D. 2016. *Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Discovery of a Recombinant Swine Enteric Coronavirus in Italy*. Emerg infect Dis 22;83-87.



ATTI DEL XLII MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA:  
COME OTTIMIZZARE LE PERFORMANCE  
IN GESTAZIONE**

*Montichiari (BS), 10-11 Marzo 2016*



# **GESTIONE DELLA SCROFA IN GRAVIDANZA, QUALI SONO I FATTORI PIÙ IMPORTANTI PER OTTIMIZZARE LE PERFORMANCE?**

Houben M.

*GD Animal Health Department, Porcine Health Management  
Postbus- Deventer, The Netherlands*

Una gestazione ottimale si conclude con la nascita di una nidiata uniforme, di suinetti vitali, che vanno rapidamente alla mammella per assumere il colostro.

In questa presentazione verranno descritti i cinque periodi principali che hanno un impatto sul successo della gestazione.

## **1. Gestione delle scrofette fino alla prima fecondazione**

Un'adeguata gestione delle scrofette è fondamentale per una gestazione ottimale. Una giovane scroffa non solo deve raggiungere il peso ideale e l'età corretta alla fecondazione, ma deve anche adattarsi al tipo di stabulazione e all'intero sistema produttivo che incontrerà in gestazione. Ciò significa che le scrofette devono adattarsi a convivere con scrofe di parità maggiore, allo stato sanitario dell'allevamento, al tipo di dieta e ai nuovi operatori.

Uno dei maggiori rischi per gli giovani animali allevati in grandi gruppi è una crescita insufficiente durante la prima gravidanza che potrebbe tradursi in una successiva diminuzione della produzione e della resistenza dell'animale, e in un motivo di riforma precoce.

## **2. Periodo di lattazione**

Durante la lattazione, vengono prodotti nuovi oociti. Se la scrofa perde troppo peso/energie durante la lattazione, vi sarà un impatto negativo sulla produttività e la qualità degli oociti. Questo si traduce in un maggiore intervallo svezzamento-estro e una morte embrionale precoce, con un conseguente tasso di parto inferiore e nidiata più piccole. Un'adeguata assunzione di cibo durante la lattazione è quindi un fattore fondamentale per il successo della gestazione successiva. L'unico modo per ridurre al minimo le perdite durante la lattazione è quello di monitorare esattamente assunzione di cibo e perdita di peso.

## **3. Le prime quattro settimane di gestazione**

Durante le prime quattro settimane di gestazione avvengono vari processi tra i quali fecondazione, riconoscimento embrionale, impianto e formazione della placenta. La scrofa è soggetta per natura alla stagionalità. Se la luce diminuisce, le temperature si abbassano o l'alimentazione non è di quantità o di qualità adeguate, molte scrofe torneranno in estro dopo 3 o 4 settimane. Quindi per una gestione ottimale della scrofa sono necessari un'alimentazione di qualità elevata, una durata uguale della luce in fecondazione e nelle sale di gestazione, controllo delle correnti d'aria e nessun tipo di stress da cinque a ventotto giorni dopo l'inseminazione. La direttiva europea 2008/210/CE prevede anche che le scrofe vengano stabulate in gruppo quattro settimane dopo la fecondazione. Di conseguenza, la scrofa trascorre una parte consistente del suo periodo di gestazione in un gruppo, e l'allevatore deve correttamente gestire anche questa situazione.

## **4. Secondo e terzo mese di gestazione**

Durante questa fase è importante evitare ogni stress e fornire una dieta adeguata alle esigenze e che eviti il sovrappeso. Inoltre, ci sono diversi sistemi di stabulazione, ognuno

con vantaggi e svantaggi. I sistemi più comuni prevedono grandi gruppi (dinamici o fissi), con stazioni di alimentazione elettronica, gruppi fissi con gabbie aperte o piccoli gruppi fissi con alimentazione a pavimento o a trogolo. Questi sistemi si differenziano per aggressione durante il pasto, ottimizzazione e condizione dei mangimi e problemi articolari o di zoppia.

#### 5. Ultima parte della gestazione, preparazione all'allattamento

Nell'ultimo mese la scrofa si prepara alla lattazione. In questo periodo l'assunzione di cibo avrà un effetto sul peso e sulla vitalità dei suinetti, ma anche sulla produzione di colostro e latte nei primi giorni dopo il parto. Inoltre, questa è la fase del periodo di gestazione in cui viene effettuata la maggior parte delle vaccinazioni, per creare una solida immunità materna al fine di proteggere i suinetti durante le prime settimane di vita.

## LA SCROFETTA: SOLUZIONI MANAGERIALI PER MASSIMIZZARE I RISULTATI

BERTACCHINI F.

*Topigs Italia srl, Manerbio (BS)*

Le scrofette sono animali molto importanti al fine della produttività aziendale, per una serie di ragioni che possono essere sintetizzate in questi 3 punti:

1. rappresentano approssimativamente il 18-20% del totale degli animali e con i tassi di riforma attuali (vicini al 45%) significa che nell'arco dell'anno quasi la metà del patrimonio zootecnico dell'allevamento verrà sostituita,
2. costituiscono un gruppo di animali ad alto potenziale, che però sono anche quelli più difficili da gestire per problematiche che possono essere legate alle procedure di adattamento non corrette, difficoltà di rilevamento dei calori, errori alimentari in fase di gestazione che si ripercuotono al momento della lattazione, ecc.,
3. rappresentano il futuro dell'allevamento.

Per queste ed altre ragioni vale la pena di focalizzare l'attenzione su questi animali. Quanto affermato fino ad ora, è confermato anche da una recente pubblicazione statunitense secondo la quale, la scrofa ripaga sé stessa (costo d'acquisto + mantenimento + spese sanitarie, per fecondazione, ecc), se raggiunge il 3° parto in un'azienda a ciclo chiuso o se addirittura raggiunge il 4° parto in un allevamento sito 1 puro. Tali parametri che possono essere aggiornati anche per la realtà italiana, pongono l'accento sul problema della riforma precoce della scrofa.

Sempre stando alla pubblicazione in oggetto, una percentuale importante di scrofe (30%) viene riformata prima che l'animale raggiunga il 3° parto e quindi con un bilancio economico individuale negativo. Questi dati sono ancora più preoccupanti perché nel calcolo effettuato non sono incluse le scrofette acquistate che non arrivano a partorire nemmeno una volta.

Se è vero che la realtà italiana non raggiunge i livelli medi di riforma statunitense (tra il 55 ed il 60%) occorre altrettanto riconoscere che il problema di un numero eccessivamente elevato di animali riformati in giovane età sussiste anche nel nostro paese.

Avere un alto tasso di riforma non solo è sconsigliato per motivi economici legati al numero di riproduttori da acquistare, ma comporta un alto tasso di figliate provenienti da scrofette primipare con suinetti generalmente più leggeri alla nascita e di conseguenza anche allo svezzamento. Inoltre per l'immunità passiva più incompleta ricevuta dalla madre, è stato calcolato che le probabilità di morte o formazione di "scartini" in svezzamento è **3 volte superiore** se compariamo i figli delle scrofe primipare con la progenie delle scrofe pluripare (*J. Deen*).



ATTI DEL XLII MEETING ANNUALE

TAVOLA ROTONDA

**DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA:  
QUANDO L'ALIMENTAZIONE  
E GLI ASPETTI SANITARI  
RAPPRESENTANO UN PUNTO CRUCIALE**



# DALLA SCROFETTA ALLA SCROFA: L'ALIMENTAZIONE COME FATTORE STRATEGICO NELL'ALLEVAMENTO DEI MODERNI RIPRODUTTORI

VINCENZI R.

*Gruppo Veronesi, Verona*

I programmi di selezione genetica negli ultimi anni stanno dando notevole impulso alle performances produttive della scrofa.

Il raggiungimento di tale obiettivo, nei suoi vari parametri, coinvolge in modo trasversale tutte le fasi del ciclo vitale dell'animale a partire dalla corretta gestione della scrofetta, primario "investimento" del patrimonio aziendale, per proseguire nella fase di gestazione e lattazione. Allo stesso livello della *genetica*, delle *strutture* e del *management*, l'*alimentazione* rappresenta una colonna fondamentale nell'applicazione della "*Precision farming*" nell'allevamento suinicolo ossia del concetto di nutrizione mirata per ottimizzare la produttività.

Le diverse case di selezione europee o d'oltreoceano, pur percorrendo strade diverse, hanno privilegiato in modo particolare il carattere di "*iper-prolificità*" e produzione di carne magra. In buona sostanza gli attuali riproduttori sono stati migliorati per produrre un numero maggiore di suinetti alla nascita selezionati per garantire, con specificità proprie delle case genetiche, una carcassa più magra che in passato.

L'aumento della prolificità richiede prima di tutto un adeguato sviluppo dell'apparato riproduttore, contestualmente ad un appropriato impianto digerente, respiratorio e mammario. Se vogliamo ottenere un numero maggiore di suinetti occorre, infatti, fornire spazio vitale alle future filiate e mettere la madre nelle migliori condizioni (aria ed alimento) per produrre elevate quantità di latte.

Tuttavia i riproduttori sono tendenzialmente più magri che in passato (minor grasso di riserva) e dotati di minore appetito.

Se ciò può risultare valido in linea generale, esistono tuttavia distinzioni non trascurabili tra i moderni genotipi, in particolare tra il modello "*americano*" e "*europeo*" con un impatto rilevante sulle caratteristiche nutrizionali dei mangimi e sulle strategie alimentari da adottare per la fase scrofetta e scrofa.

Per la fase di accrescimento l'obiettivo comune è di raggiungere il p.v. di 135-140 kg ma, secondo le raccomandazioni suggerite dai rispettivi modelli, in età diverse e quindi con caratteristiche nutrizionali dei mangimi e programmi alimentari differenziati (ad lib vs razione).

Analogamente in gestazione i fabbisogni alimentari subiscono sensibili variazioni in relazione allo stadio di gravidanza.

Un esempio è la dinamica dei fabbisogni aminoacidici, con differenze molto elevate tra inizio e fine gestazione, a seguito dell'aumento del peso corporeo, lo sviluppo dei feti e del tessuto mammario.

L'impiego di un solo mangime, benchè somministrato con un idoneo sistema di razionamento, può non garantire il pieno soddisfacimento dei fabbisogni nutrizionali.

Per tale motivo la strategia "*multifase*", con l'impiego di più mangimi in fase di gestazione, somministrati separatamente o opportunamente miscelati, appare appropriata, per quanto non sempre agevolmente applicabile in tutte le realtà.



# L'INTEGRAZIONE DI PROTOCOLLI SANITARI NELLE SCROFETTE DA RIMONTA

MARCO E.<sup>1</sup>, ROMAGOSA A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Marco Vetgrup SL, Barcelona, Spain

<sup>2</sup>PIC Europe, Barcelona, Spain

La quarantena e l'acclimatamento sono punti critici all'inizio della carriera produttiva delle scrofette da rimonta. Lo scopo di queste fasi è quello di prevenire l'introduzione di nuovi patogeni, di mantenere la stabilità dell'allevamento, e di permettere agli animali di adattarsi ai patogeni presenti nell'allevamento prima di entrare in produzione.

L'obiettivo della **quarantena** è quello di impedire l'introduzione di nuovi agenti patogeni nell'allevamento di destinazione. La quarantena dovrebbe sempre avere una durata di almeno 30 giorni, gestita in all-in-all-out (AI/AO), e preferibilmente in un'unità separata. Idealmente, questa struttura dovrebbe essere ad almeno 2 km dall'unità produttiva di destinazione, con via d'accesso indipendente all'interno dell'allevamento.

Lo scopo principale dell'**acclimatamento** è invece quello di far entrare in contatto le scrofette con gli agenti patogeni presenti in allevamento, e fornire un'immunità protettiva prima dell'introduzione. Di solito si ottiene attraverso vaccinazioni, utilizzando il feedback nei locali di isolamento, e introducendo anche svezzati, scrofe da riforma o ingrassi come animali di contagio (seeder). Un corretto acclimatamento richiede un attento monitoraggio clinico. Un tempo di esposizione troppo breve potrebbe indurre un'immunità inadeguata, ma, allo stesso modo, un'esposizione troppo protratta ad un agente vivo potrebbe indurre malattia o anche morte dell'animale.

Il livello di biosicurezza sia in quarantena che in acclimatamento deve essere sempre lo stesso dell'allevamento ricevente.

Il processo che porta all'introduzione della scrofetta in allevamento coinvolge molti fattori, quelli più rilevanti o con un significativo impatto sulle diverse fasi del processo verranno dettagliate di seguito.

| Processo |                                 | Quarantena                         | Acclimatamento          |                          |
|----------|---------------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Fase     |                                 | Sorveglianza                       | Esposizione             | Recupero                 |
| Scopo    |                                 | evitare l'introduzione di malattie | massimizzare l'immunità | minimizzare l'escrezione |
| Fattore  | quarantena (edificio/processo)  | +++                                | -                       | -                        |
|          | posizione                       | +++                                | -                       | -                        |
|          | stato sanitario iniziale        | +++                                | ++                      | +                        |
|          | GDU sito unico vs multi-sito    | ++                                 | +++                     | ++                       |
|          | flusso GDU (AIAO vs CF)         | ++                                 | +++                     | ++                       |
|          | frequenza di introduzione       | -                                  | +++                     | +++                      |
|          | stato sanitario di destinazione | -                                  | ++                      | +++                      |
|          | età di introduzione             | -                                  | ++                      | +++                      |

GDU: Gilt Development Unit; AIAO: all in- all out; CF: flusso continuo.

Una situazione “ideale”, che bilanci stato sanitario e produttività nelle rimonte, dovrebbe prevedere:

- Introduzione periodica di scrofette: bilanciamento dei parti nella struttura.
- Peso:  $\geq 85\%$  delle scrofette fecondate entro i 135-150 Kg.
- Fecondazione: almeno 6 settimane nell'unità produttiva prima della fecondazione.
- Nessun challenge sanitario.
- Nessuna procedura sanitaria durante le tre settimane prima della fecondazione-protocolli sanitari completati prima di questa data.

Ma, nella realtà la situazione è la seguente:

- Un acclimatemento non adeguato non è una situazione rara: un'esposizione efficace, un buon recupero e un'immunità adeguata sono necessari per evitare la malattia.
- Stato sanitario non stabile: introduzione troppo precoce in un allevamento che non è ancora pronto per ricevere le rimonte.
- Personale: elevato turn-over, tecnici e strumenti che passano da popolazioni infette a negative.
- Scrofette:
  - basso numero di introduzioni di scrofette per anno;
  - scrofette fecondate pochi giorni dopo l'introduzione nell'unità produttiva;
  - peso elevato alla prima fecondazione.

### **Raccomandazioni importanti riguardo quarantena e acclimatemento**

1. Non “comprare una malattia”:
  - a. limitare l'apporto genetico al minor numero possibile di fonti. Cercare di avere un unico allevamento fornitore;
  - b. il veterinario aziendale deve essere informato dello stato sanitario di tutti gli allevamenti che gli forniscono le rimonte. La valutazione e il monitoraggio sanitario di questi fornitori deve essere continua.
2. Distanza dall'unità produttiva principale: idealmente dovrebbe essere di circa 2 km. Se per motivi strutturali questo non fosse possibile, la raccomandazione pratica è di avere l'unità di rimonta il più lontano possibile dall'unità produttiva principale, in un edificio separato.
3. Durata di quarantena/acclimatemento: l'età delle scrofette che entrano in allevamento dipende dai patogeni presenti e dal tempo di esposizione degli animali necessario per ottenere stabilità e perché siano pronti a entrare in allevamento. Si raccomandano 4 settimane di quarantena e quanto più tempo possibile per l'acclimatemento. Questo tempo è sufficiente agli animali per mostrare eventuali segni di malattie di cui sono portatori ed anche per sviluppare le malattie che possono aver contratto da poco. Se la PRRS è un problema, si dovrebbe estendere il periodo di quarantena a 90 giorni.
4. Persone e flussi: il contatto con l'uomo è indispensabile in questa fase, dato che gli animali non hanno avuto molta familiarità con l'uomo nell'allevamento di origine. Durante le fasi di quarantena e l'isolamento, le procedure e le manipolazioni sugli animali sono molte: vaccinazioni, controlli di calore, ecc. Lo stress che possiamo indurre agli animali in questa fase può avere effetti negativi sulle successive fasi produttive. Le persone che si occupano delle rimonte dovrebbero seguire restrittive

- norme igieniche e di biosicurezza, come non spostarsi dalle unità di isolamento a quelle produttive, o almeno cambiare indumenti e stivali prima di passare da un'unità all'altra.
5. All In/All Out:  
La quarantena dovrebbe essere gestita in all in /all out in modo da poter controllare il livello di esposizione ai patogeni. Tra lotti differenti dovrebbero essere effettuate pulizie e disinfezioni adeguate.
  6. Stabulazione:
    - a. Spazio: le scrofette dovrebbero avere 1,5m<sup>2</sup> per animale. Se gli animali hanno troppo spazio possono ferirsi o avere più problema alle zampe. Il pavimento dovrebbe essere asciutto e in buone condizioni. Evitare umidità eccessiva e pavimenti bagnati. Evitare spigoli vivi, sporgenze o angoli, pavimenti e alimentatori che possano causare lesioni.
    - b. Assicurare che luce, temperatura (idealmente 17-22°C), e ventilazione siano adeguati.
  7. Monitoraggio sanitario:  
Monitorare costantemente la salute delle scrofette in isolamento. I patogeni target per ogni allevamento devono essere determinati dal veterinario aziendale prima dell'introduzione in allevamento.

**Acclimatamento, il punto chiave nella stabilità sanitaria dell'allevamento. Come far adattare le rimonte ai patogeni più frequenti negli allevamenti?**

Come principio generale l'obiettivo è quello di introdurre scrofette del più elevato stato sanitario possibile, e assicurare che abbiano una buona immunità nei confronti delle malattie dell'allevamento ricevente. I protocolli sanitari devono essere sviluppati da un veterinario che conosca le dinamiche delle malattie all'interno dell'allevamento specifico, e non solo ripresi tal quali da altri allevamenti.

Le scrofette hanno bisogno di 3 settimane dopo l'esposizione ai patogeni per sviluppare un'immunità attiva (per la maggior parte dei patogeni) e, a seconda della malattia, di un tempo variabile per recupero e clearance (ad esempio, fino a 60 giorni per PRRSV).

La vaccinazione degli animali per sviluppare un'immunità acquisita e/o l'esposizione diretta ai patogeni dell'allevamento ricevente per sviluppare un'immunità naturale, sono le due strategie utilizzate durante l'acclimatamento. Solitamente vengono associati anche trattamenti strategici per minimizzare i sintomi, ma a livelli adeguati per permettere comunque l'infezione.

| Metodo di esposizione       | Esempi   |
|-----------------------------|--|
| Feedback                    | Parvovirus, PEDV, TGEV, Rotavirus, altri agenti di diarrea       |
| Infezione diretta/iniezione | PRRSV  |
| “Seeder” /suini infetti     | <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> , altri Mycoplasmas, Pasteurella |
| Vaccinazione                | PRRSV, PCV2, IAV, Erysipelas, Parvovirus, App                    |
| Ambientale/passive          | Parvovirus   |

**L'acclimatamento naturale** comporta il contatto con animali seeder dell'allevamento di destinazione, in associazione alla pratica di “feedback”. Per l'esposizione si presume che gli animali seeder dell'allevamento ricevente siano in quel momento escretori di virus o batteri. Come consiglio, un rapporto di una scrofetta nullipara o primipara a 20 animali è considerato soddisfacente per l'esposizione. Tuttavia, il rapporto esatto della popolazione di esposizione alla popolazione in entrata non è scientifico e dipende anche dal tasso di trasmissione (R) dell'agente patogeno.

| Malattia                | R stimato | Fonte bibliografica  |
|-------------------------|-----------|----------------------|
| IAV                     | 10.4      | Allerson et al, 2012 |
| PRRSV                   | 2.6       | Charpin et al, 2012  |
| <i>M. hyopneumoniae</i> | 1.16      | Meyns et al, 2004    |
| PCV2                    | 5.9       | Andraud et al, 2009  |

I protocolli di feedback sono importanti soprattutto per generare un'immunità materna contro diversi agenti patogeni che colpiscono i suinetti nel periodo neonatale. Nonostante non vi siano molti lavori scientifici alla base della pratica del feedback, i dati raccolti in diversi allevamenti hanno mostrato un'importante riduzione dell'incidenza di nidiatale sintomatiche da quei gruppi che avevano ricevuto il feedback. I tre consigli principali riguardo il feedback sono i seguenti:

1. Utilizzare solo materiale di feedback fresco. I batteri possono produrre tossine piuttosto rapidamente (alcune ore), e alcuni agenti patogeni dopo periodi più o meno lunghi possono modificarsi soprattutto nelle loro proprietà immunogeniche. Il consiglio è quello di utilizzare il materiale di feedback lo stesso giorno in cui viene raccolto.
2. Fornire il feedback più volte in isolamento e in animali fecondati, e disporre del tempo necessario perché l'escrezione si esaurisca prima che le scrofe entrino in sala parto. Fare il feedback sei, cinque e quattro settimane prima del parto, con ogni animale che riceve dosi multiple ogni settimana, è una pratica comune.
3. Testare il materiale utilizzato. È difficile ottenere protezione nei confronti di rotavirus C, Clostridium, ecc. se non sono presenti nel materiale fecale. Testare il materiale fornisce informazioni sul tipo e la quantità dei patogeni desiderati presenti. Si può congelare una grande quantità di materiale in un formato conveniente per la somministrazione, fino alla fine delle analisi. Queste scorte congelate di feedback possono poi essere utilizzate regolarmente.

### I principali agenti patogeni

I due agenti patogeni principali da considerare in questa fase, sono il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRSV) e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Recentemente, anche PCV2 è stato incluso in questo gruppo, a causa di problemi di efficacia vaccinale e comparsa di sintomatologia associata a PCV2 in molti allevamenti suini in tutta l'UE.

1. *PRRSV*: la maggior parte degli allevamenti di riproduttori forniscono scrofette negative/naïve per PRRSV ad allevamenti positivi. Quindi, l'obiettivo principale nell'adattamento delle scrofette è di infettare l'animale con il ceppo/i di PRRSV presente/i in allevamento, e che l'animale non sia viremico al momento dell'entrata nell'unità produttiva.
  - a. Esposizione naturale di scrofette naïve:
    - esposizione di scrofette ad un ceppo omologo di PRRSV mediante inoculazione. Il tempo di esposizione è controllato, contemporaneamente si può fare esposizione ad altri patogeni.
    - contatto diretto con suinetti svezzati o scrofe (P1): esposizione non costante al virus e immunità di allevamento non omogenea; non garantisce l'esposizione contemporanea e allo stesso livello di tutti gli animali, la viremia può essere più prolungata perché gli animali non si infettano contemporaneamente. Il rispetto delle misure di biosicurezza è necessario per minimizzare il rischio di trasmissione del virus tra allevamenti e intra allevamento in entrambi i casi.
  - b. Vaccinazione di scrofette naïve:
    - vaccini vivi attenuati: forniscono una esposizione costante nei gruppi vaccinati grazie all'esposizione di tutti gli animali contemporaneamente ad una corretta quantità di

- vaccino. È semplice da applicare, e può ridurre la durata della viremia nel gruppo di scrofette vaccinate. Può però causare l'introduzione di nuovi ceppi di virus in allevamento, e non è prevedibile la cross-protezione per altri ceppi del virus;
- vaccini inattivati: sono scarsamente efficaci in scrofette naïve se non vi è stata prima un'esposizione naturale o una vaccinazione a virus vivo.
2. *Mycoplasma hyopneumoniae*: il problema principale con *Mycoplasma* è il lungo periodo di escrezione dopo l'infezione (200 giorni) (Pieters et al, 2009) e la più lenta diffusione nella popolazione (si veda la velocità di trasmissione nella tabella qui sopra). Quando introduciamo scrofette naïve per *Mycoplasma* in un allevamento positivo con l'obiettivo principale che gli animali abbiano già eliminato l'infezione al parto, dobbiamo esporle a *Mycoplasma* al più tardi a 1 mese di età. In realtà, la maggior parte degli allevamenti non è in grado di mantenere in fase di acclimatemento gli animali per questo periodo di tempo, quindi nel caso in cui l'allevamento abbia una rimonta esterna, si consiglia di vaccinare le scrofe giovani due volte prima di arrivare all'età di fecondazione. La vaccinazione non previene infezione ed escrezione, ma l'escrezione è più breve e la sintomatologia è assente o lieve. Poiché si tratta di un vaccino inattivato, la maggior parte degli allevamenti può essere d'accordo nel vaccinare gli animali prima della consegna.
  3. *PCV2*: *PCV2* può essere trasmesso verticalmente in utero, nel colostro e nel latte. È importante per le scrofe da rimonta non essere viremiche per *PCV2* durante gestazione e allattamento. L'esposizione e l'infezione durante la gestazione può portare alla nascita di suinetti infetti, ma apparentemente sani. Si consiglia di testare le rimonte per anticorpi e viremia per implementare un protocollo di vaccinazione per *PCV2* nel periodo pre-fecondazione.

### **Gli altri agenti patogeni**

Oltre PRRSV, *Mycoplasma* e *PCV2* ci sono molti altri patogeni che dobbiamo considerare perché il programma di introduzione delle scrofette sia efficace. App, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Actinobacillus suis*, e i patogeni enterici sono anch'essi da tener presenti nel quadro sanitario. Quando si scrive il piano sanitario di esposizione e stabilizzazione delle scrofette prima della loro introduzione in allevamento, è importante pensare a come ogni malattia viene trasmessa in condizioni normali.

Per i patogeni intestinali l'esposizione tramite feedback è spesso adeguata come già ricordato sopra. Per i patogeni che coinvolgono il tratto respiratorio o le tonsille, l'esposizione ad animali seeder, che sono attivi escretori del patogeno, è la via più efficace per ottenere un'immunità attiva.

Altri patogeni che devono essere aggiunti al programma di acclimatemento e stabilizzazione sono *Mycoplasma hyorhinis/hyosynoviae*. Non esistendo vaccini efficaci disponibili in commercio per questi due agenti, si sta ancora cercando la soluzione migliore per creare un'immunità attiva efficace prima che le scrofe entrino in produzione.

### **Riassunto**

Le scrofette sono importanti per la produttività generale e la stabilità sanitaria dell'allevamento. Il corretto approccio alla loro introduzione e all'acclimatemento è ancora da standardizzare: molti allevamenti non riconoscono questi punti come fattori chiave, o ancora, alcuni flussi di produzione non ottimizzano il potenziale della combinazione di una buona gestione con un corretto stato sanitario.

Ogni allevamento deve avere il suo proprio protocollo sanitario, e un'ottima conoscenza dell'epidemiologia dei patogeni presenti in allevamento è un punto cruciale per l'introduzione delle rimonte. La quarantena e l'acclimatemento sono gli strumenti non negoziabili di questo processo.



# **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**



# AGGIORNAMENTO DEL QUADRO EPIDEMIOLOGICO DI ASCARIS SPP. IN ITALIA

GAMBETTA B.<sup>[1]</sup>, PERRONE V.<sup>[2]</sup>, GABRIELLI S.<sup>[1]</sup>, CAVALLERO S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive, Sapienza Università di Roma ~ Roma ~ Italy,* <sup>[2]</sup>*Dipartimento di Prevenzione, Az.USL Roma B ~ Roma ~ Italy*

Keywords: *Ascaris*, ITS *cox2* genotyping, molecular epidemiology

## Riassunto

L'Italia è un Paese tradizionalmente votato alla suinocoltura dove le attività di monitoraggio sanitario degli allevamenti intensivi devono ancora tener conto dell'insorgenza di patologie che seppur definite "minimali" sono ancora in grado di produrre ingenti danni economici. Tra le patologie minimali, l'ascaridiosi nei suini è una infestazione che determina un ritardo nella crescita e la formazione sulla superficie del fegato di macchie biancastre (milk spot) limitando la commerciabilità della carne destinata al consumo umano. *Ascaris suum* e *Ascaris lumbricoides* infestano rispettivamente il suino e l'uomo e l'alta similarità morfologica e biologica tra i due taxa li pone ancora al centro di un dibattito circa l'appartenenza o meno alla stessa specie, secondo il concetto biologico. Infatti, tra *Ascaris* spp. Dell'uomo e del suino è stata dimostrata sia la presenza di flusso genico sia una differenza del genoma mitocondriale di un valore molto più basso di quello che solitamente distingue due specie. Studi di epidemiologia molecolare hanno dimostrato che la fonte di infestazione in Italia, dove l'ascariasi umana mostra ormai una bassa prevalenza, è principalmente il suino. Analisi filogenetiche eseguite su sequenze mitocondriali di esemplari di *Ascaris* spp. Umano e suino da regioni geografiche endemiche e non endemiche hanno mostrato relazioni evolutive molto vicine. Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare esemplari di *Ascaris* spp. Ottenuti da suini e da uomini campionati in Italia, per identificare l'agente eziologico dell'ascariasi umana nel nostro territorio e per osservare i genotipi circolanti nei suini, per un ulteriore aggiornamento dell'epidemiologia molecolare.

## Abstract

Italy is a traditionally pig farming voted country and the veterinary monitoring activities for intensive farms still must take into account the outbreak of "minimal" pathologies that may cause significant economic damages. Ascariidiosis is one of the minimal pathologies that affect pigs, eliciting a growth deficit and "milk spots" lesions on the liver surface, limiting the meat marketability. *Ascaris suum* and *Ascaris lumbricoides* infect pigs and humans, respectively. Their taxonomic uncertainty is based on the high morphological and biological similarities and scientific community suggests that they belong to the same species. In particular, recent findings demonstrated the presence of gene flow between human and pig *Ascaris* spp. and a low genetic variability in mtDNA. Molecular epidemiological studies showed that the source of infection in Italy, a non endemic country for human ascariasis, is mostly the pig. Phylogenetic studies based on mtDNA sequences from human and pig *Ascaris* spp. originated from endemic and non endemic countries, showed very close evolutionary relationships. The aim of this study was to characterize at molecular level specimens of human and swine *Ascaris* spp. from Italy to distinguish the three genotypes (*suum*, *lumbricoides* and heterozygote) and to identify the aetiological agent of human ascariasis for an update of molecular epidemiology.

## INTRODUZIONE

L'ascaridiosi è considerata ancora ad oggi una malattia negletta tropicale nonostante infesti più di un miliardo di persone nel mondo prevalentemente nei paesi in via di sviluppo, mentre nei

paesi industrializzati compresa l'Italia è quasi scomparso. Anche *A. suum* è cosmopolita negli allevamenti suini e la sua prevalenza dipende dalle buone pratiche di gestione, ma solo pochi allevamenti ne sono completamente privi. L'infestazione suina può comportare una riduzione nella commercializzazione delle carni con un forte impatto sulla redditività delle attività dell'allevamento (10, 11). Lo status tassonomico dei due nematodi è attualmente oggetto di studio in quanto presentano similarità morfologiche, genetiche e biochimiche. Inoltre, diversi studi hanno mostrato la presenza di ibridi, flusso genico e trasmissione crociata e una differenza del genoma mitocondriale molto più bassa di quella che solitamente distingue due specie (3,5, 6). L'incertezza tassonomica causa notevoli difficoltà nella definizione dei contesti epidemiologici, che può comportare conseguenze negative sulla pianificazione delle strategie di controllo sia in ambito sanitario umano sia in quello veterinario. Nelle regioni non endemiche, come l'Europa e il Nord America, la trasmissione all'uomo è principalmente zoonosica, al contrario delle regioni altamente endemiche come ad esempio Cina, Guatemala e Africa dove il ciclo di trasmissione di *A. lumbricoides* e *A. suum* sembra essere distinto, ma studi più recenti hanno mostrato la presenza di infestazioni crociate e ibridi anche in Cina e in Uganda dove uomini e suini vivono in simpatia (1, 12). Inoltre, un recente caso-studio ha dimostrato la presenza di un ascaride con genotipo ibrido tra le due specie in un allevatore di suini della provincia di Cuneo (4). Studi di filogenesi eseguiti con lo scopo di indagare le relazioni evolutive tra esemplari provenienti da entrambi gli ospiti e da regioni endemiche e non endemiche, hanno permesso l'identificazione di tre cladi (A, B, C) dove gli aplogruppi non sembrano suddivisi seguendo criteri di endemicità o di affiliazione all'ospite, sebbene il clade C mostrava una stretta specificità per l'ospite suino (2, 3).

## **MATERIALI E METODI**

In questo studio sono stati analizzati 10 esemplari da uomo e 190 da suini provenienti da numerosi allevamenti italiani utilizzando l'analisi dei profili di restrizione della regione ribonucleare ITS (13), metodo che è in grado di differenziare il genotipo *A. suum*, *A. lumbricoides* e ibrido. Sono state inoltre analizzate le sequenze del gene mitocondriale *cox1* di un sottocampione rappresentativo usando il network della Parsimonia e la filogenesi Bayesiana per definire l'appartenenza al clade A, B o C.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **Risultati**

I risultati totali sui profili di restrizione dell'ITS nei nematodi da uomo e suino mostrano un'origine suina in circa l'80% delle infestazioni. In entrambi gli ospiti è stata riscontrata la presenza di tutti e tre genotipi. La maggior parte delle infestazioni umane è dovuta al genotipo suino, confermando il potenziale zoonosico di *A. suum* in Italia (Figura 1), mentre le infestazioni suine mostrano una bassa percentuale della presenza del genotipo umano (6%). Le analisi filogenetiche (Figura 2) mostrano una distribuzione degli aplotipi mitocondriali in tre cladi (A, B e C) dove si riscontra la presenza di aplotipi condivisi da esemplari che provengono da entrambi gli ospiti in ogni clade. Anche il clade C mostra la presenza di due esemplari di origini umana, confermando i dati recentemente pubblicati da Betson et al., (2).

### **Discussione**

Gli allevamenti intensivi rappresentano un ambiente artificiale per i suini e l'ascaridiosi, come altre elmintiasi, è tuttora presente come malattia sub-clinica scarsamente sintomatica. Il persistere di questa parassitosi nell'allevamento intensivo del suino in Italia nonostante la disponibilità e l'uso di farmaci è di certo legato alla mancanza e/o costante attuazione di adeguate misure igieniche e di biosicurezza (7). Il rilievo di tale infestazione all'ispezione post-mortem al macello può essere considerato sia un valido indicatore del livello igienico-sanitario degli

allevamenti ma anche della loro redditività (8) sia come un osservatorio epidemiologico fondamentale per le attività di Sanità Pubblica Veterinaria per la prevenzione delle malattie diffuse (9). Studi precedenti sull'incidenza dell'ascaridiosi sui ricavi, sui costi variabili annuali e sulle performances alla macellazione in aziende suinicole piemontesi hanno evidenziato un impatto economico dell'infestazione più ingente negli allevamenti a ciclo aperto caratterizzati da alta prevalenza di *A. suum* (8). I risultati totali della presente indagine molecolare sui nematodi rinvenuti in suini provenienti da allevamenti intensivi non hanno mostrato alcuna differenza genetica fissata tra gli esemplari di *Ascaris* spp. di origine suina e umana e le analisi dei pattern di restrizione dell'ITS hanno confermato l'alto potenziale zoonotico in Italia. Le analisi filogenetiche basate sulle sequenze della regione mitocondriale della *cox1* hanno mostrato che la segregazione degli aplotipi non segue alcun criterio di origine geografica o di affiliazione all'ospite, ma la maggior parte della variabilità genetica viene osservata a livello individuale e di popolazione, sostenendo l'ipotesi che i due taxa rappresentano due varianti della stessa specie.

## BIBLIOGRAFIA

- 1- Betson, M., Nejsumb, P., Llewellyn-Hughes, J., Griffin, C., Atuhaire, A., Arinaitwe, M., Adriko, M., Ruggiana, A., Turyakira, G., Kabatereine, N.B., and Stothard J.R. (2012). Genetic diversity of *Ascaris* in southwestern Uganda. *Trans. R. Soc. Med. Hyg.* 106, 75–83.
- 2- Betson, M., Nejsumb, P., Bendall, R.P., Deb, R.M., Stothard, J.R. (2014). Molecular epidemiology of ascariasis: a global perspective on the transmission dynamics of *Ascaris* in people and pigs. *J. Infect. Dis.* 210, 932-41. doi: 10.1093/infdis/jiu193.
- 3- Cavallero, S., Snabel, V., Pacella, F., Perrone, V., D'Amelio, S. (2013). Phylogeographical studies of *Ascaris* spp. based on ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2170. doi: 10.1371/journal.pntd.0002170
- 4- Dutto, M., Petrosillo, N. (2013) Hybrid *Ascaris suum/lumbricoides* (Ascarididae) infestation in a pig farmer: a rare case of zoonotic ascariasis. *Cent Eur J Public Health* 4, 224-226.
- 5- Leles, D., Gardner, S.L., Reinhard, K., Iñiguez, A., and Araujo, A. (2012). Are *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* a single species?. *Parasit. Vectors.* 5,42.
- 6- Liu, G.H., Wu, C.Y., Song, H.Q., Wei, S.J., Xu, M.J., Lin, R.Q., Zhao, G.H., Huang, S.Y., and Zhu, Y.Q. (2012). Comparative analyses of the complete mitochondrial genomes of *Ascaris lumbricoides* and *Ascaris suum* from humans and pigs. *Gene* 492, 110–116.
- 7- Martelli, P. et al., (2013) *Le patologie del maiale*. Editore: Le Point Veterinaire Edizione: 9/2013.
- 8- 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. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, p. 121, XLI Meeting annuale 19-20 marzo 2015.
- 9- Perrone, V., Cito, G., Pacella, F., Cavallero, S., (2013) Elmintiasi in suini da allevamento intensivo: rilievi ispettivi al macello. *Summa. Animali da reddito.* 20, 19-27.
- 10- Razzini, P., Bignami, S., (2008) Ruolo del macello come osservatorio delle infestazioni da endoparassiti: aspetti sanitari ed economici. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, p. 29, XXXIV Meeting annuale 13-14 maggio 2008.
- 11- Skallerup, P., Nejsumb, P., Jørgensen C.B., Göring H.H.H., Karlskov-Mortensen P., Archibald A.L., Fredholm M., Thamsborg S.M. (2012) Detection of a quantitative trait locus associated with resistance to *Ascaris suum* infection in pigs. *Int. J. Parasitol.* 42, 383-391.
- 12- Zhou, C., Li, M., Yuan, K., Deng, S., Peng, W. (2012). Pig *Ascaris*: an important source of human ascariasis in China. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1172-1177.
- 13- Zhu, X.Q., Chilton, N.B., Jacobs, D.E., Boes, J., and Gasser, R.B. (1999). Characterisation of *Ascaris* from human and pig hosts by nuclear ribosomal DNA sequences. *Int. J. Parasitol.* 29, 469-478.



# BENESSERE DEI SUINETTI ALLA CASTRAZIONE: RISULTATI PRELIMINARI DELL'ESPRESSIONE DI ALCUNI MIRNA E CORTISOLO NELLA SALIVA

POLLONI A.<sup>[1]</sup>, ARCHETTI I.<sup>[1]</sup>, AVANZINI C.<sup>[2]</sup>, VINCO L.J.<sup>[1]</sup>, GIACOMELLI S.<sup>[1]</sup>,  
LOMBARDI G.<sup>[1]</sup>, CECILIANI F.<sup>[3]</sup>, LECCHI C.<sup>[3]</sup>, ROTA NODARI S.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "B. Ubertini", Brescia ~ Brescia ~ Italy,*

<sup>[2]</sup>*libero professionista ~ cremona ~ Italy,* <sup>[3]</sup>*Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy*

Keywords: castrazione, saliva, miRNA

## Riassunto

Per questo studio sono stati selezionati un totale di 35 suinetti sottoscrofa di 3-4 giorni di vita, suddivisi in 3 gruppi. Il gruppo A ha ricevuto un anestetico locale e un antidolorifico prima della castrazione, il gruppo B è stato castrato senza utilizzo di farmaci e il gruppo C è stato esclusivamente manipolato. Per valutare il dolore/stress indotto dalla castrazione e/o dalla manipolazione nei diversi gruppi di trattamento, da ogni soggetto è stato prelevato un campione di saliva prima dell'intervento di castrazione o di manipolazione (F1) e dopo 30-45 minuti (F3) al fine di dosare il cortisolo e alcuni miRNA (miR-19b, miR-27b e miR-365). Durante la castrazione sono stati rilevati dati di tipo comportamentale mediante una scheda validata. Il delta di cortisolo e la rilevazione comportamentale hanno evidenziato un punteggio di dolore inferiore nel gruppo trattato e un minor incremento di cortisolo anche se statisticamente le differenze tra gruppi sono apparse non significative. Per quanto riguarda i miRNA, l'analisi statistica ha evidenziato un incremento significativo di miR-19b nel gruppo B da F1 a F3, e di miR-365 nel gruppo A da F1 a F3 mentre la differenza non è risultata statisticamente significativa tra prima e dopo il trattamento per il gruppo B e C. Osservando i valori di AUC delle curve ROC miR-19b si è dimostrato essere il più efficace a discriminare tra gruppo di animali castrati senza utilizzo di farmaci e con utilizzo di anestetico locale e antinfiammatorio.

## Abstract

A total of 35 piglets 3-4 days old, divided into 3 groups were selected for this study. Group A received a local anesthetic and a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) before castration, group B was castrated without use of drugs and the group C was only manipulated (control group). All subjects were sampled by salivary swabs placed in the mouth prior to surgery castration (F1) and 30-45 minutes after surgery (F3) or after been only manipulated to quantify cortisol and some miRNAs (miR-19b, miR-27b and miR-365). During castration behavioral data were recorded on a validated form. Delta cortisol (cortisol in F1-F3) and behavioral observations showed a minor pain score and raise in cortisol in the treated group compared to the others, even if differences between groups were not statistically significant. Regarding miRNA, the statistical analysis showed significant increase of miR-19b in group B from F1 to F3, and of miR-365 in group A from F1 to F3 while the difference before and after treatment between group B and C was not statistically significant. The values of AUC (Area Under the Curve) of ROC curve (Receiver Operating Characteristic), showed that miR-19b is the most useful miRNA to discriminate between the groups of castrated animals with or without the use of drugs.

## **INTRODUZIONE:**

Ai sensi del Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146 “La castrazione e’ consentita per mantenere la qualità dei prodotti e le pratiche tradizionali di produzione a condizione che tali operazioni siano effettuate prima del raggiungimento della maturazione sessuale da personale qualificato, riducendo al minimo ogni sofferenza per gli animali”, mentre ai sensi del Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n.122, solo se la castrazione viene effettuata dopo il settimo giorno di vita dell’animale questa deve obbligatoriamente essere praticata da un medico veterinario con l’utilizzo dell’anestesia e la somministrazione prolungata di analgesici. Tuttavia, la “European declaration on alternatives to surgical castration of pigs” (2010), di cui l’Associazione Nazionale Allevatori Suini è firmataria, si impegna ad abbandonare la castrazione a partire dal primo gennaio 2018 e, come primo passo, ad effettuare una prolungata analgesia e/o anestesia con metodi mutualmente riconosciuti a partire dal primo gennaio 2012. Sono stati proposti diversi metodi alternativi alla castrazione chirurgica, quali l’immunocastrazione, la macellazione dei maschi a pesi inferiori, l’utilizzo di seme sessato, la selezione genetica o la scelta di una alimentazione e un management ad hoc finalizzati alla riduzione dello sviluppo di scatofo e androstenone. L’anestesia generale mediante anestetici inalatori o somministrazione CO<sub>2</sub> è adottata in alcuni paesi del Nord Europa, ma è di fatto non praticabile negli allevamenti italiani e nel caso della CO<sub>2</sub> i benefici complessivi da un punto di vista del benessere animale necessitano di maggiori approfondimenti (Candotti, 2010). L’utilizzo di anestetici locali, quali la lidocaina o la procaina associata ad adrenalina, ha il potenziale di ridurre gli effetti negativi derivanti dall’anestesia totale quali la mancata suzione del latte e il rischio di schiacciamento da parte della scrofa, ma pochi sono gli studi che ne valutano l’efficacia di riduzione del dolore. L’analgesia viene utilizzata ancora più raramente dell’anestesia e soltanto in alcuni stati come Paesi Bassi, Slovenia e Ungheria dove, solo una minoranza degli intervistati ha dichiarato di utilizzarli comunemente o sempre (Fredriksen et al., 2009). I principi attivi che si sono dimostrati efficaci nel controllo del dolore alla castrazione del suino sono rappresentati dagli antinfiammatori non steroidei (FANS) ed essenzialmente ketoprofene (Prunier et al., 2006), meloxicam (Keita et al., 2010; Zöls et al., 2006) e metamizolo (Fredriksen et al., 2009). Non essendo possibile quantificare direttamente il dolore indotto dalla castrazione, a livello sperimentale sono stati utilizzati la quantificazione dell’incremento di cortisolo ematico (Prunier et al., 2005; Hay et al., 2003; Prunier et al., 2006; Kattesh et al., 1996; Kohler et al., 1998) e schede di rilevazione comportamentale (Rota Nodari et al., 2011). Il cortisolo viene solitamente dosato in campioni di plasma, ma il prelievo ematico di per sé ne influenza i livelli poiché è esso stesso un evento stressante in grado di inficiare l’esito del successivo campionamento. Inoltre, tutte quelle pratiche sperimentali che possono potenzialmente causare dolore, sofferenza, distress, danno prolungato equivalente o superiore all’introduzione di un ago, necessitano di autorizzazione ai sensi della Dir. 2010/63/UE. Negli ultimi anni l’interesse nei metodi non invasivi è quindi aumentato orientando la ricerca verso la misurazione degli ormoni in matrici non invasive quali saliva (nel suino in rapporto di circa 1:10 rispetto al plasma, Parrott et al., 1989), urine, feci (Laws, 2007), pelo (Accorsi 2008), penne (Bortolotti 2008) e uova (Royo 2008).

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali**

Per la prova è stato selezionato un allevamento commerciale di 350 scrofe a ciclo chiuso con gestione a bande. I suini erano incroci Hermitage con finale Duroc. Per la prova sono stati selezionati 35 suinetti omogenei, in buone condizioni corporee e di salute di 3-4 giorni di vita. Ciascun suinetto è stato assegnato a random ad uno dei tre gruppi sperimentali.

### **Trattamento**

I suinetti del gruppo A (n=15) sono stati sottoposti a trattamento con FANS (meloxicam) e anestetico locale (procaina associata ad adrenalina). I farmaci sono stati somministrati seguendo le indicazioni dei rispettivi foglietti illustrativi. In particolare il meloxicam è stato iniettato per via IM nella regione del collo, mentre l'anestetico mediante siringa da insulina all'interno di ogni testicolo (0.125 ml/testicolo).

Il gruppo B (n=10) è stato castrato seguendo le normali procedure.

Per il gruppo C (n=10) sottoposto unicamente a manipolazione, è stata mimata la posizione di castrazione senza procedere alla sua effettuazione.

### Metodologia

Di seguito vengono riportate le procedure e le rilevazioni effettuate nelle diverse fasi (F1;F2;F3).

F1 (T-5-10minuti): prelievo salivare 5-10 minuti prima del trattamento; per il gruppo A somministrazione del trattamento.

F2 (T0): Castrazione, taglio coda, somministrazione ferro e antibiotico, scheda comportamentale (gruppi A e B); manipolazione (gruppo C);

F3 (T + 30-45 minuti): 2° prelievo salivare.

### Prelievi salivari

Tutti i prelievi sono stati eseguiti il mattino tra le ore 8.00 e le ore 12.00. Il prelievo di saliva è stato eseguito su animali in posizione di stazione quadrupedale, sorretti a livello dell'addome da un altro operatore, con tamponi Salivette® come descritto da Gallagher et al. (2002). I campioni mantenuti refrigerati (4-8°C) sono stati consegnati al laboratorio in giornata.

### Castrazione

La castrazione è stata effettuata mediante l'utilizzo di bisturi, come descritto da Leman et al., 1992.

### Scheda di valutazione etologica

Per la valutazione della presenza di una sintomatologia algica al momento della castrazione, è stata utilizzata una scheda di rilievo comportamentale validata (Rota Nodari et al., 2011).

### Procedura analitica di titolazione del cortisolo

In laboratorio le provette Salivette® sono state centrifugate refrigerate a 3500 rpm per 15 minuti. La saliva è stata poi trasferita mediante micropipette in criovials e portata alla temperatura di -195.82°C in azoto liquido per poi essere trasferite in congelatore a -80°. Il cortisolo è stato quantificato mediante metodica immunometrica di tipo competitivo in chemiluminescenza, con l'analizzatore automatico IMMULITE ONE (Medical System, Genova, Italia) e il kit commerciale LKC01 (Medical System, Genova, Italia), in uso presso il laboratorio di biochimica clinica e controllo qualità prodotti, animali e reagenti, IZSLER, Brescia.

### Procedura analitica di quantificazione dell'espressione dei miRNA

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit miRNeasy Serum/Plasma Quiagen seguendo le istruzioni del produttore.

### Analisi statistica

Per i titoli di cortisolo e il punteggio totale di dolore alla castrazione è stata effettuata una statistica descrittiva mentre con il test di Shapiro-Wilk si è valutata la normalità della distribuzione. È stato eseguito il Test T tra gruppi con distribuzione normale e il test di Kruskal-

Wallis tra gruppi con distribuzioni casuali. Il delta di cortisolo è stato calcolato sul singolo soggetto come differenza tra F3 e F1 su singolo animale.

La normalità della distribuzione di ciascuna delle variabili miRNA è stata valutata utilizzando test di Shapiro-Wilk. Poiché i dati non erano distribuiti normalmente è stato utilizzato il test non parametrico di Wilcoxon per l'analisi delle differenze di espressione miRNA. La curva ROC è stata utilizzata per determinare la sensibilità e la specificità del test di discriminare tra gli animali prima e dopo la castrazione.

**RISULTATI E DISCUSSIONE:**

I risultati relativi all'elaborazione statistica dei dati per il cortisolo e per la scheda comportamentale sono riportati in tabella 1.

| Gruppo | Fase | N campioni | Punteggio scheda (media±ds) | Cortisolo media±ds (µg/dl) | Delta cortisolo (F3-F1) (media±ds) |
|--------|------|------------|-----------------------------|----------------------------|------------------------------------|
| A      | F1   | 14         |                             | 0.759 <sup>a</sup> ±0.531  | 0.052 <sup>a</sup> ±0.590          |
|        | F2   |            | 8.838 <sup>a</sup> ±3.653   |                            |                                    |
|        | F3   | 13         |                             | 0.842 <sup>a</sup> ±0.377  |                                    |
| B      | F1   | 4          |                             | 0.475 <sup>a</sup> ±0.292  | 0.360 <sup>a</sup> ±0.311          |
|        | F2   |            | 10.661 <sup>a</sup> ±2.786  |                            |                                    |
|        | F3   | 6          |                             | 1.048 <sup>a</sup> ±0.407  |                                    |
| C      | F1   | 9          |                             | 0.809 <sup>a</sup> ±0.556  | -0.126 <sup>a</sup> ±0.865         |
|        | F3   | 10         |                             | 0.804 <sup>a</sup> ±0.828  |                                    |

Tabella 1. descrittiva del dosaggio del cortisolo nei diversi gruppi di trattamento. (Per lettere uguali nella medesima colonna p≥0.05)

I risultati relativi all'elaborazione statistica per i dati dei miRNA sono riportati nel grafico 1.

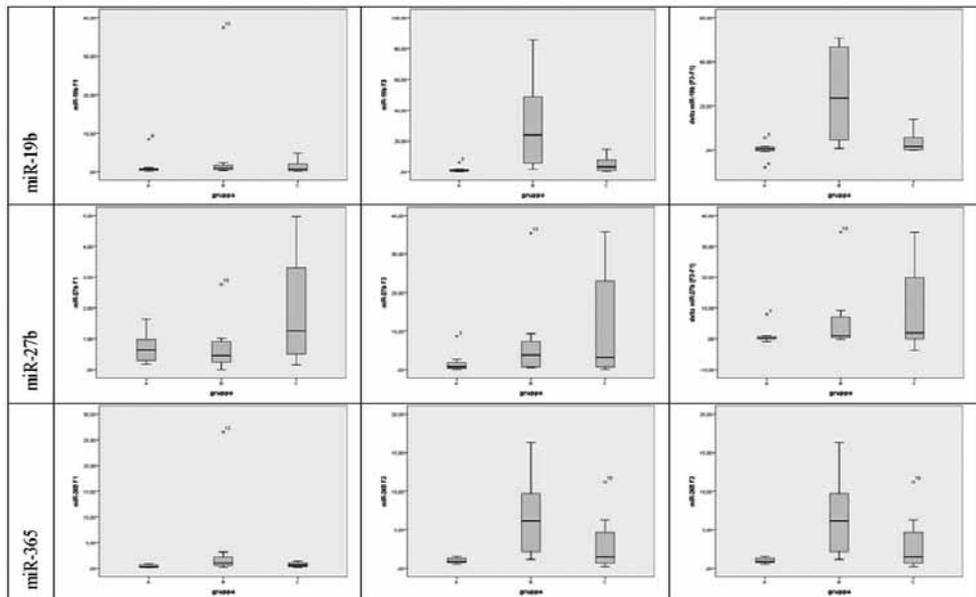


Grafico 1. box-whiskers relativi a miR-19b, miR-27b e miR-365 in F1, F3 e delta (F3-F1) nei gruppi.

Il test non parametrico di Wilcoxon prova che vi è differenza significativa ( $p \leq 0.05$ ) per miR-19b in F3 tra i gruppi A e B e tra i gruppi B e C; per miR-365 vi è differenza significativa ( $p \leq 0.05$ ) in F3 tra i gruppi A e B mentre non vi è differenza statisticamente significativa ( $p > 0.05$ ) per miR-27b in F1 in nessuno dei tre gruppi considerati.

Attraverso la valutazione delle curve ROC e del calcolo dell'area sottesa a tali curve (AUC) si è potuta verificare quanto un miRNA è sensibile e specifico nel discriminare tra gruppi. I risultati relativi alle AUC sono riportati in tabella 2.

| Gruppi | miR-19b |       |       | miR-27b |       |       | miR-365 |       |       |
|--------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
|        | F1      | F3    | Delta | F1      | F3    | Delta | F1      | F3    | Delta |
| B-A    | 0.625   | 0.946 | 0.893 | 0.562   | 0.750 | 0.732 | 0.848   | 0.964 | 0.679 |
| C-A    | 0.516   | 0.719 | 0.703 | 0.703   | 0.734 | 0.656 | 0.711   | 0.594 | 0.531 |
| C-B    | 0.634   | 0.804 | 0.786 | 0.732   | 0.500 | 0.500 | 0.643   | 0.750 | 0.607 |

Tabella 2. Differenti AUC per i vari miRNA tra gruppi in F1 e F3.

I risultati relativi alla scheda comportamentale hanno evidenziato un punteggio complessivo di dolore, sebbene non statisticamente significativo, inferiore nel gruppo trattato A rispetto al gruppo B. Più difficili da interpretare sono gli esiti del cortisolo salivare a causa del numero ridotto dei soggetti nei quali è stato possibile valutare il delta. La quantità di saliva recuperabile in suinetti sottoscrofa è, infatti, più limitata rispetto al campione ematico, pertanto in molti animali non è stato possibile effettuare sia l'analisi dei miRNA che del cortisolo per esaurimento della matrice. Prove precedenti eseguite in laboratorio avevano comunque evidenziato un delta di cortisolo salivare inferiore nei soggetti sottoposti ad anestetico + antidolorifico rispetto ai soggetti sottoposti esclusivamente ad antidolorifico (Rota Nodari, dati non mostrati). Mendell et al. (2012) hanno identificato cinque meccanismi con cui i miRNA potrebbero influenzare i segnali di stress: mediazione del segnale, modulazione del segnale, feedback negativo, feedback positivo e mantenimento della stabilità del segnale. I cinque meccanismi d'azione non sono mutualmente esclusivi.

L'analisi statistica, ha evidenziato come miR-19b incrementi in modo significativo nel gruppo B da F1 a F3 e come miR-365 incrementi nel gruppo A da F1 a F3 mentre non vi è differenza statisticamente significativa tra prima e dopo il trattamento per il gruppo B e C.

Osservando le curve ROC si può osservare che  $AUC=0.946$  e  $AUC=0.964$  in F3 rispettivamente per miR-19b e miR-365. Questi due miRNA risultano essere indicatori più sensibili e più specifici di miR-27b. Per quanto riguarda la differenza tra i gruppi B e A  $AUC$  è rispettivamente 0.893 per miR-19b e 0.679 per miR-365 quindi, evidentemente miR-19b risulta più efficace al fine di discriminare tra gruppo di animali castrati senza utilizzo di farmaci e con utilizzo di anestetico locale e antinfiammatorio. La differenza tra F3 ed F1 per miR-19b è statisticamente significativa anche tra gruppi C e B con  $AUC=0.786$  quindi questo miRNA si dimostra abbastanza sensibile e specifico anche per discriminare tra gruppo di animali solo manipolato (C) e gruppo di animali castrati senza ausilio farmacologico (B); meno tra C e A.

L'esposizione ad un evento traumatico e stressante acuto modifica permanentemente i circuiti neuronali e recentemente i miRNA sono emersi come nuovi biomarker di diverse patologie ma anche di eventi stressanti.

In particolare miR-19b, appartenente al cluster miR 17-92, è implicato nel pannello di

risposta allo stress nel ratto (Balakathiresan et al., 2014), è altresì indicato come potenziale biomarker di eventi paurosi anche ritardati rispetto all'evento originale. Per quanto riguarda miR-27b, esso è sempre correlato all'evento traumatico ma non si ritrova nel siero quanto nell'amigdala che è la parte del sistema limbico che gestisce le emozioni in modo specifico il dolore. Secondo Balakathiresan et al., la up regulation di miR-27b e in misura minore di miR-19b sarebbe correlata alla sensazione dolorifica nei ratti oggetto dell'esperimento.

I livelli di miR-365 rimangono piuttosto invariati nei gruppi B e C in F3 rispetto ad F1, mentre si evidenzia l'aumento in F3 e nel conseguente delta per il gruppo A. Il loro ruolo non è stato ancora individuato con precisione; nell'uomo è associato allo sviluppo del cancro (Zhou et al., 2013) regolando negativamente la produzione di interleuchina 6 (IL-6), una citochina coinvolta nella risposta immunitaria, nell'ematopoiesi e nell'infiammazione (Xu et al., 2011).

Determinare quanto un animale provi dolore e il suo grado di stress rappresenta sicuramente una sfida per la ricerca, soprattutto quando la finalità sia quella di valutare a livello applicativo l'efficacia nella riduzione del dolore. Sebbene siano correntemente utilizzati alcuni strumenti quali schede comportamentali o dosaggio del cortisolo, è necessario un perfezionamento nella loro applicazione e l'introduzione di nuovi strumenti di misurazione.

La possibilità di dosare il cortisolo dalla matrice saliva anche in soggetti molto piccoli è senza dubbio incoraggiante, ma è necessario ampliare l'unità campionaria e valutare più tempistiche post-evento stressante per individuare il momento migliore per il prelievo e il derivante delta di cortisolo.

Molto promettenti appaiono i risultati relativi ai miRNA salivari individuati per la prima volta nei suini da questo studio ed espressi in modo diverso nei diversi gruppi di trattamento. Queste molecole, espresse più precocemente rispetto al cortisolo potrebbero rappresentare la nuova frontiera di valutazione del dolore e dell'efficacia delle molecole nel loro controllo. Per quanto preliminari, i dati osservati in questo studio indicano come l'utilizzo di un anestetico locale associato ad antidolorifico riduca l'espressione di miR-19b nei soggetti castrati.

Il lavoro è stato eseguito durante le pratiche di castrazione programmata aziendale senza interferire sul normale operato. Gli animali non sono stati sottoposti ad alcuna pratica dolorosa pari o superiore all'infissione di un ago.

## **BIBLIOGRAFIA:**

- Aguggini, G., Beghelli, V., & Giulio, L. F. (1992). Fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia-UTET.
- Ahanda, M. L. E., Zerjal, T., Dhone-Pollet, S., Rau, A., Cooksey, A., & Giuffra, E. (2014). Impact of the Genetic Background on the Composition of the Chicken Plasma MiRNome in Response to a Stress. *PloS one*, 9(12), e114598.
- Balakathiresan, N. S., Chandran, R., Bhomia, M., Jia, M., Li, H., & Maheshwari, R. K. (2014). Serum and amygdala microRNA signatures of posttraumatic stress: Fear correlation and biomarker potential. *Journal of psychiatric research*, 57, 65-73.
- Candotti, P., Rota Nodari, S., (2010) La nostra proposta per la sterilizzazione del suino. 30 Giorni Dicembre 2010.
- Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146 Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti (GU n. 95 del 24-04-2001)
- Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 122 Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini (GU n.178 del 2-8-2011 )
- Direttiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010

sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici

- European Declaration on alternatives to surgical castration of pigs [http://ec.europa.eu/food/animals/welfare/practice/farm/pigs/castration\\_alternatives/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/animals/welfare/practice/farm/pigs/castration_alternatives/index_en.htm)
- Fredriksen, B., Font i Furnols, M., Lundström, K., Migdal, W., Prunier, A., Tuytens, F. A., & Bonneau, M. (2009). Practice on castration of piglets in Europe. *Animal*, 3(11), 1480-1487.
- Gallagher, N. L., Giles, L. R., & Wynn, P. C. (2002). The development of a circadian pattern of salivary cortisol secretion in the neonatal piglet. *Neonatology*, 81(2), 113-118.
- 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(3), 201-218.
- Horn, T., Marx, G., & Von Borell, E. (1999). [Behavior of piglets during castration with and without local anesthesia]. *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift*, 106(7), 271-274.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L. (Eds.). (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press.
- Kattesh, H. G., Brown, M. E., Masincupp, F. B., & Schneider, J. F. (1996). Protein-bound and unbound forms of plasma cortisol in piglets after castration at seven or 14 days of age. *Research in veterinary science*, 61(1), 22-25.
- Keita, A., Pagot, E., Prunier, A., & Guidarini, C. (2010). Pre-emptive meloxicam for postoperative analgesia in piglets undergoing surgical castration. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*, 37(4), 367-374.
- Klemcke, H. G., Nienaber, J. A., & Hahn, G. L. (1989). Plasma adrenocorticotrophic hormone and cortisol in pigs: Effects of time of day on basal and stressor-altered concentrations. *Experimental Biology and Medicine*, 190(1), 42-53.
- Kohler, I., Moens, Y., Busato, A., Blum, J., & Schatzmann, U. (1998). Inhalation anaesthesia for the castration of piglets: CO2 compared to halothane. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 45(1-10), 625-633.
- Leman, A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S. & Taylor D.J., (1992) *Diseases of Swine* (7th edn) Iowa State University Press
- McGlone, J. J., & Hellman, J. M. (1988). Local and general anesthetic effects on behavior and performance of two- and seven-week-old castrated and uncastrated piglets. *Journal of animal science*, 66(12), 3049-3058.
- Mendell, J. T., & Olson, E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172-1187.
- Parrott, R. F., Misson, B. H., & Baldwin, B. A. (1989). Salivary cortisol in pigs following adrenocorticotrophic hormone stimulation: comparison with plasma levels. *British Veterinary Journal*, 145(4), 362-366.
- Prunier, A., Bonneau, M., Von Borell, E. H., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., ... & Velarde, A. (2006). A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-*, 15(3), 277.
- Prunier, A., Bonneau, M., Von Borell, E. H., Cinotti, S., Gunn, M., Fredriksen, B., ... & Velarde, A. (2006). A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-*, 15(3), 277.
- Prunier, A., Mounier, A. M., & Hay, M. (2005). Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs. *Journal of Animal Science*, 83(1), 216-222.

- Rota Nodari, S., Guerra, O., Sassi, M., Nassuato C., Gastaldo, A., Della Casa, G., Archetti, I.L., Lombardi, G., Candotti, P. (2011) Validazione di una scheda comportamentale di rilevazione del dolore nei suinetti sottoposti a castrazione. XXXVII Meeting annuale SIPAS, Piacenza.
- White, R. G., DeShazer, J. A., Tressler, C. J., Borcher, G. M., Davey, S., Waninge, A., Clemens, E. T. (1995). Vocalization and physiological response of pigs during castration with or without a local anesthetic. *Journal of Animal Science*, 73(2), 381-386.
- Xu, Z., Xiao, S. B., Xu, P., Xie, Q., Cao, L., Wang, D., ... & Fang, L. R. (2011). miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry*, 286(24), 21401-21412.
- Zheng, Y., Chen, K. L., Zheng, X. M., Li, H. X., & Wang, G. L. (2014). Identification and bioinformatics analysis of microRNAs associated with stress and immune response in serum of heat-stressed and normal Holstein cows. *Cell Stress and Chaperones*, 19(6), 973-981.
- Zhou, M., Liu, W., Ma, S., Cao, H., Peng, X., Guo, L., ... & Shi, W. (2013). A novel onco-miR-365 induces cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 34(7), 1653-1659.
- Zöls, S., Ritzmann, M., & Heinritzi, K. (2005). [Effect of analgesics on the castration of male piglets]. *Berliner Und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*, 119(5-6), 193-196.

# UTILIZZO DELL'ANESTESIA LOCALE DURANTE LA CASTRAZIONE DEL SUINETTO: VALUTAZIONE DEL DOLORE

TAVELLA G.<sup>[1]</sup>, SCOLLO A.<sup>[1]</sup>, MAZZONI C.<sup>[1]</sup>, CONTIERO B.<sup>[2]</sup>, GOTTARDO F.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*Università degli Studi di Padova ~ Legnaro ~ Italy*

Keywords: Castration, Local anesthesia, Thermography

## Riassunto

A causa della crescente pressione dell'opinione pubblica, la suinicoltura si sta orientando verso lo sviluppo di metodi alternativi alla castrazione chirurgica dei suinetti. Scopo del presente lavoro è stato valutare, tramite indicatori comportamentali e fisiologici, l'efficacia dell'anestesia locale nel ridurre il dolore durante la castrazione. Inoltre, ai classici indicatori di dolore, è stata affiancata la termocamera quale strumento innovativo di indagine. Sono rientrati nella prova 132 suinetti maschi, divisi in tre gruppi: solo manipolati (M), castrati senza analgesia ©, ed anestesia locale (AL).

Alla castrazione sono state raccolte le reazioni degli animali, mentre il comportamento nelle ore successive è stato osservato 15 minuti per tre volte dopo la castrazione (0h00, 1h00, 3h30). I campioni di sangue sono stati raccolti 0h30 e 2h00 dopo la castrazione per la valutazione dei livelli di cortisolo, concomitantemente al rilievo della temperatura rettale. Durante la stessa manipolazione è stata registrata la temperatura del cranio e dell'occhio con la termocamera. I risultati hanno indicato differenze significative tra il gruppo M ed il gruppo C per tutte le reazioni comportamentali, e per i comportamenti stazione, decubito laterale e poppata sincronizzata. Inoltre è emerso un aumento alla castrazione del cortisolo a 2h00 ed un calo della temperatura registrata con la termocamera. Livelli intermedi sono stati osservati per tutte le variabili nel gruppo trattato con anestesia locale (AL). Concludendo, il trattamento con anestesia locale dei suinetti alla castrazione riduce le alterazioni di parametri comportamentali e fisiologici indicatori di dolore. I risultati suggeriscono che l'uso dell'anestesia locale può ridurre il dolore indotto dalla castrazione nei suinetti, migliorandone lo stato di benessere.

## Abstract

For the increasing animal welfare concerns and the public opinion pressure, alternative methods to surgical castration of piglets will have to be implemented. Aim of this study was to evaluate, by behavioural and physiological indicators, the effectiveness of local anesthesia administered before castration to alleviate the pain. The study involved 132 male piglets, divided into three groups: handled only (M), castrated without analgesia ©, and treated with local anesthesia before castration (AL). Reactions were recorded at castration, and behaviour was observed for 15 minutes at three time point from castration (0h00, 1h00, 3h30). Blood samples were collected 0h30 and 2h00 after castration for cortisol concentration, together with rectal temperature. At the same time, thermography was assessed on cranial and eye areas. Results showed significant differences in M group compared to C for the reactions, and for standing, lateral lying and synchronized suckling. Moreover, cortisol level was increased at 2h00 and cranial and eye temperature decreased. Levels of all the parameters were intermediate between M and C group for AL piglets. In conclusion, local anesthesia at castration reduces alterations in behavioural and physiological indicators of pain in piglets. The findings suggest that local anesthesia could decrease the pain induced by castration in piglets, improving the welfare of piglets in practice.

## **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 (2; 18). 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 (17). 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 almeno 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 verificare l'effetto dell'anestesia locale nell'alleviare il dolore durante e post-castrazione nei suinetti, affiancando la termocamera ad i più comuni parametri comportamentali e fisiologici indicatori di dolore.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali**

La prova ha coinvolto un totale di 132 suinetti (ibridi commerciali). 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 destrano ed il taglio della coda sono stati effettuati al termine della prova, in modo da evitare qualsiasi influenza con i parametri valutati.

### **Trattamenti**

I suinetti sono stati suddivisi in tre gruppi di trattamento, ciascuno rappresentato da 44 soggetti. Ciascun gruppo di trattamento era rappresentato all'interno della stessa nidiata da uno oppure due suinetti, a seconda del numero di maschi all'interno della nidiata. I tre trattamenti erano: 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); AL = Anestesia Locale iniettando 0,2 ml nel sottocute del rafe mediano dello scroto e 0,1 ml in ciascun epididimo di Aticain® (procaina cloridrato 40 mg/ml ed adrenalina tartrato 0,036 mg/ml).

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 ad una prima valutazione comportamentale durante la castrazione. Sono state registrate sei reazioni, tratte da quelle elencate da Rota Nodari et al. (16). Ogni reazione è stata valutata per ciascun suinetto attribuendo uno score da 1 (poco evidente) a 3 (estremamente evidente). Le reazioni sono elencate di seguito:

- Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette vocalizzazioni
- Il suinetto alla castrazione del 1° testicolo emette urla intense e continue
- La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 1° testicolo è violenta
- Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette vocalizzazioni
- Il suinetto alla castrazione del 2° testicolo emette urla intense e continue
- La reazione (tentativi di divincolamento) alla castrazione del 2° testicolo è violenta

È stata poi effettuata una seconda valutazione comportamentale post-castrazione, tramite tre osservazioni comportamentali dirette post-intervento, ciascuna della durata di 30 minuti e con inizio dopo 0h00, 1h00, 3h30 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 seguenti comportamenti era impegnato ciascun suinetto: cammina, stazione, decubito laterale, decubito sternale, poppata sincronizzata, seduto. 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. Concomitantemente al prelievo di sangue, negli stessi suinetti è stata misurata la temperatura rettale.

Inoltre, è stata effettuata una rilevazione della temperatura tramite l'utilizzo della termocamera. Recenti studi hanno infatti affermato che nel suino sottoposto a castrazione, la temperatura dell'occhio (8) e del cranio (1) si alterano. Entrambe queste aree sono state investigate subito dopo la castrazione, dopo 30 minuti e dopo 2 ore.

## RISULTATI E DISCUSSIONE:

Valutazione comportamentale durante la castrazione: le reazioni

Quasi tutte le reazioni valutate hanno manifestato differenza statistica dello score medio tra i suinetti castrati senza anestetico ed i suinetti manipolati. A valori intermedi tra questi due gruppi si sono collocati gli score medi del gruppo castrato con anestesia locale relativamente alle vocalizzazioni emesse durante la rimozione di entrambi i testicoli e le urla intense emesse durante la rimozione del secondo testicolo (tabella 1).

|  | Trattamento              |                          |                           | <i>P</i> -value |
|--|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------|
|  | Castrato                 | Manipolato               | Anestesia<br>Locale       |                 |
| <b>Rimozione del primo testicolo</b>   |                          |                          |                           |                 |
| Vocalizzazioni                         | 2,25 ± 0,84 <sup>a</sup> | 1,45 ± 0,72 <sup>b</sup> | 2,08 ± 0,92 <sup>ab</sup> | 0,007           |
| Urla intense                           | 2,33 ± 0,70 <sup>a</sup> | 1,37 ± 0,71 <sup>b</sup> | 2,21 ± 0,78 <sup>a</sup>  | < 0,001         |
| Divincolamenti                         | 1,37 ± 0,64              | 1,08 ± 0,28              | 1,46 ± 0,59               | ns              |
| <b>Rimozione del secondo testicolo</b> |                          |                          |                           |                 |
| Vocalizzazioni                         | 2,33 ± 0,81 <sup>a</sup> | 1,17 ± 0,38 <sup>b</sup> | 2,04 ± 0,95 <sup>ab</sup> | < 0,001         |
| Urla intense                           | 2,62 ± 0,57 <sup>a</sup> | 1,12 ± 0,45 <sup>b</sup> | 2,25 ± 0,85 <sup>ab</sup> | < 0,001         |
| Divincolamenti                         | 1,62 ± 0,71 <sup>a</sup> | 1,04 ± 0,20 <sup>b</sup> | 1,58 ± 0,71 <sup>a</sup>  | 0,003           |

Tabella 1. Score medio ± deviazione standard delle reazioni osservate.

Valutazione comportamentale post-castrazione: le frequenze comportamentali

I comportamenti che hanno fatto emergere differenze tra i suinetti castrati senza anestetico ed

i manipolati sono “stazione” ( $P = 0,50$ ), “poppata sincronizzata” ( $P = 0,48$ ) e, con una tendenza statistica, anche “decubito laterale” ( $P = 0,58$ ). Nello specifico, i manipolati hanno passato meno tempo in stazione rispetto ai castrati convenzionali; più tempo al capezzolo della madre per una poppata sincronizzata con gli altri fratelli della nidiata; e più tempo in decubito laterale. Il gruppo trattato con anestetico locale ha manifestato frequenze intermedie (Figura 1).

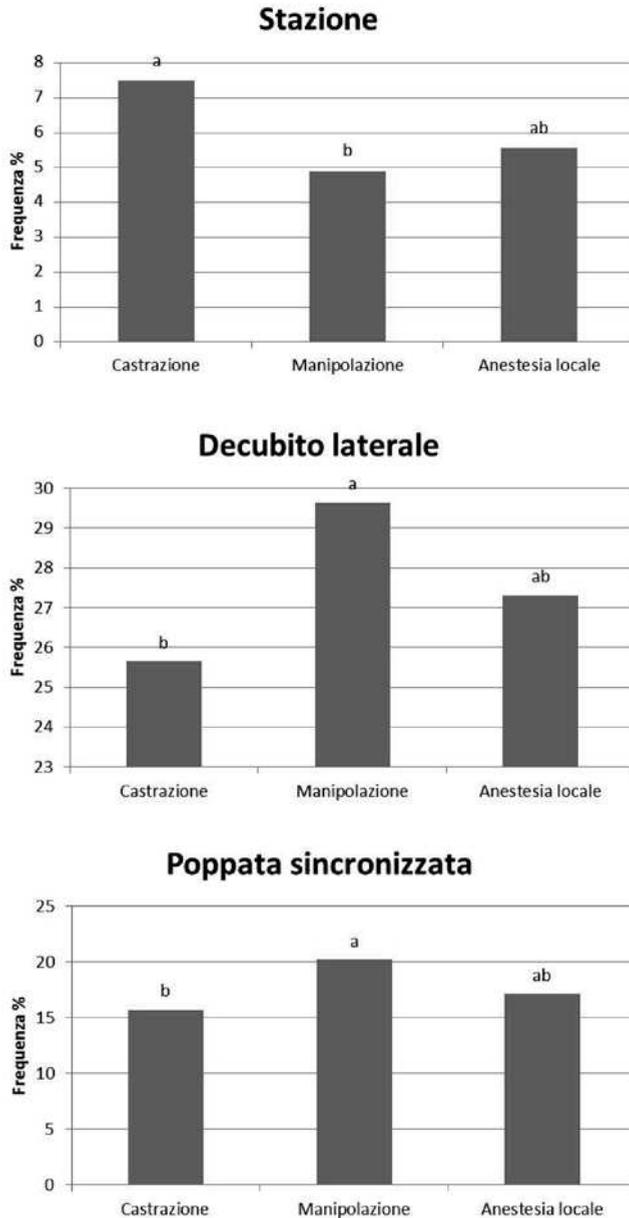


Figura 1. Frequenza percentuale dei comportamenti risultati essere differenti nei gruppi di trattamento.

## Cortisolo

Mentre il primo prelievo di cortisolo non ha dato differenze significative, il secondo ha fatto emergere livelli sensibilmente maggiori di cortisolo nei suinetti castrati senza anestetico (6,33 vs 4,50 microgr/dl;  $P < 0,05$ ). Livelli intermedi tra manipolati e castrati in modo convenzionale sono stati evidenziati per il gruppo con anestetico locale (4,50 microgr/dl).

## Temperatura rettale

Solo nel secondo rilievo della temperatura, i manipolati hanno mostrato valori differenti (ed inferiori) rispetto ai castrati convenzionali. Tuttavia la temperatura rettale dei gruppi trattati con anestetico locale è risultata essere uguale a quella dei castrati convenzionali.

## Termocamera

Mentre nell'ultima osservazione non sono emerse differenze tra i gruppi, delle differenze significative sono emerse nella differenza di temperatura tra la prima e la seconda rilevazione per quanto riguarda la temperatura massima dell'occhio e la temperatura minima del cranio (Figura 2).

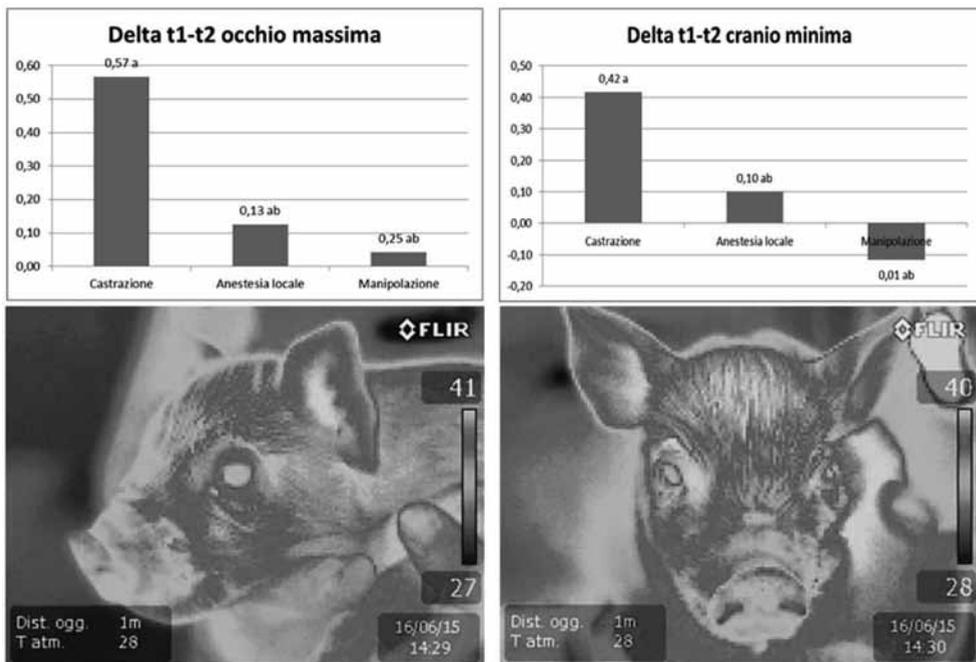


Figura 2. Livelli medi di differenza di temperatura tra la prima e la seconda rilevazione nei gruppi di trattamento.

La castrazione chirurgica del suinetto è un intervento che provoca modificazioni comportamentali e fisiologiche indicative di dolore acuto (4). Anche nel presente lavoro, la castrazione senza l'utilizzo di anestetico locale (C) ha portato all'alterazione di alcuni parametri rispetto ai valori osservati nel gruppo dei manipolati (M).

L'analisi delle reazioni manifestate dai suinetti durante la castrazione ha confermato quanto già esposto da Rota Nodari et al. (16): alcune reazioni, tra cui le vocalizzazioni, le urla intense ed i divicolamenti durante la rimozione dei testicoli sono maggiormente manifestate dagli animali sottoposti a castrazione senza alcuna anestesia rispetto ai suinetti castrati con anestetico locale.

Lo studio del comportamento ha fatto emergere anche altre differenze durante l'osservazione dei suinetti riposti nella gabbia parto dopo la castrazione. In particolare, i comportamenti o posizioni maggiormente alterati dal dolore della castrazione sono stati la stazione, il decubito laterale e la poppata sincronizzata. Il gruppo C ha mostrato una maggiore permanenza in posizione di stazione in immobilità. Diversi autori attribuiscono l'alterazione di questa attività/posizione non specifica, normalmente espressa dai suinetti, come la risposta al dolore provocato dalla castrazione chirurgica (10; 18; 5). È possibile infatti che alcune attività, quali soprattutto la deambulazione, provochino ulteriore dolore al suinetto e che per questo vengano evitate (Llamas-Moya et al. 2008). Questo adattamento comportamentale è descritto da Mellor et al. (11) come un processo protettivo che permette agli animali di ridurre la stimolazione dolorifica dei tessuti coinvolti.

I suinetti castrati senza anestetico (C) hanno inoltre manifestato una minore frequenza di decubito laterale 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. (15) elencano tra le posture ed i comportamenti correlati al dolore anche il decubito, che diventa sternale e non più laterale. Nel suino, la riduzione del decubito laterale a favore di quello sternale è stata precedentemente osservata da Hay et al. (5) e Llamas Moya et al. (7) dopo la castrazione, ma simili risultati sono emersi anche nell'agnello (12; 13). L'ipotesi più plausibile è che il decubito laterale aumenti la percezione dello stimolo dolorifico aumentando 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 senza anestetico (C) trascorrono meno tempo alla mammella insieme ai fratelli rispetto ai manipolati (M), in accordo con quanto evidenziato da Hay et al. (5) nelle prime ore dopo la castrazione. Anche Mellor et al., (11) e Llamas Moya et al. (7) 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. I risultati comportamentali ottenuti nel presente lavoro sono confermati dai livelli di cortisolo sierico dei suinetti. Infatti, il gruppo C ha innalzato i suoi livelli sierici misurati dopo due ore dalla castrazione rispetto ai valori registrati nel gruppo dei suinetti manipolati. Questo risultato è in accordo con quanto riportato da Sutherland et al. (17) che registrano l'aumento del cortisolo nelle prime 2 ore post-castrazione, ed è confermato anche dai dati di Prunier et al. (14), Carroll et al. (2), and Marchant-Forde et al. (9), sebbene il primo prelievo (a 30 minuti dalla castrazione) non abbia mostrato le stesse differenze statisticamente significative. Secondo diversi autori (Wood et al., 1991; 13) il cortisolo sierico rappresenta un efficace indicatore della presenza e dell'intensità dello stress acuto negli animali, specie se associato ad una valutazione comportamentale (6). La significatività della rilevazione della cortisolemia dopo l'evento stressante è riportata in numerosi lavori (14; 2; 9; 17). Tra i parametri considerati nel presente lavoro, il più innovativo è stato certamente la temperatura oculare e craniale misurate con la termocamera. Sia la temperatura massima dell'occhio che la minima del cranio sono scese tra il momento della castrazione e la successiva mezz'ora, ma nel gruppo dei castrati senza anestetico (C) il calo è stato più evidente. Il risultato sembra non essere in linea con l'unico altro studio ad oggi presente in letteratura sull'argomento in campo suino (8), in quanto gli autori avevano riportato un aumento della temperatura massima dell'occhio nei soggetti castrati anziché un calo. Tuttavia è opportuno sottolineare che le tempistiche con le quali sono state fatte le rilevazioni sono differenti e non si può escludere che l'aumento della temperatura avvenga nell'immediato post-castrazione, come osservato nei vitelli anche da Dockweiler et al. (3), per poi calare successivamente. Ad ogni modo sembra evidente che l'alterazione della temperatura oculare sia un parametro da approfondire durante la castrazione in quanto espressione del coinvolgimento del sistema nervoso parasimpatico associato alla

percezione del dolore viscerale. La stessa attivazione del sistema nervoso a seguito dell'evento dolorifico e stressante può aver portato a vasocostrizione periferica e a conseguente riduzione della temperatura minima della cute del cranio, come già precedentemente osservato da Bates et al. (1). Nessuna differenza invece per quanto riguarda la temperatura rettale. I suinetti, se preventivamente trattati con anestesia locale (AL), hanno mostrato alterazioni di comportamento, cortisolo sierico e termocamera meno marcate rispetto al gruppo dei castrati non trattati (C), se non in qualche caso equiparabili con il gruppo dei manipolati (M). Il risultato suggerisce che i livelli di percezione del dolore dei suinetti trattati con anestetico locale siano stati intermedi rispetto ai due gruppi di riferimento C ed M. Concludendo, i risultati ottenuti confermano che la castrazione provoca alterazioni comportamentali e fisiologiche che suggeriscono una condizione di dolore legata all'intervento. L'utilizzo di anestesia locale prima della castrazione dei suinetti riduce l'espressione di parametri indicatori di dolore e stress, limitando le manifestazioni algiche degli animali nel post-intervento associate al tentativo di minimizzare la sofferenza. La preventiva somministrazione dell'anestetico locale (procaina cloridrato 40 mg/ml ed adrenalina tartrato 0,036 mg/ml) sembra dunque essere auspicabile per il miglioramento del benessere dei suinetti durante e dopo la castrazione.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Bates J.L., Karriker, L.A., Stock M.L., Pertzborn K.M., Baldwin L.G., 2014. The Impact of Translactational Delivered Meloxicam Analgesia on Biomarkers of Pain and Distress after Piglet Processin. Animal Industry Report: AS 660, ASL R2836. Available at: [http://lib.dr.iastate.edu/ans\\_air/vol660/iss1/1](http://lib.dr.iastate.edu/ans_air/vol660/iss1/1)
2. 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.
3. Dockweiler JC, Coetzee JF, Edwards-Callaway LN, Bello NM, Glynn HD, Allen KA, Theurer ME, Jones ML, Miller KA and Bergamasco L 2013. Effect of castration method on neurohormonal and electroencephalographic stress indicators in Holstein calves of different ages. *Journal of Dairy Science* 96, 4340–4354.
4. Fredriksen B., Johnsen A.M.S., Skuterud E. 2011. Consumer attitudes towards castration of piglets and alternatives to surgical castration. *Research in Veterinary Science* 90:352–357.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Lonardi C, A. Scollo, S. Normando, M. Brscic and F. Gottardo, 2014. Can novel methods be useful for pain assessment of castrated piglets? *Animal*, doi:10.1017/S1751731114003176
9. 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.
10. 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.

11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. Rota Nodari S., Guerra O., Sassi M., Nassuato C., Gastaldo A., Della Casa G., Archetti I. L., Lombardi G., Candotti P. Validazione di una scheda comportamentale di rilevazione del dolore nei suinetti sottoposti a castrazione. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento Suino*, 2011.
17. 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.
18. 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.

# MONITORAGGIO AL MACELLO DELLE ULCERE GASTRICHE NEL SUINO PESANTE ITALIANO

SCOLLO A.<sup>[1]</sup>, BOTTACINI M.<sup>[2]</sup>, GOTTARDO F.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet ~ Reggio Emilia ~ Italy,* <sup>[2]</sup>*dipartimento MAPS, Università degli Studi di Padova ~ Legnaro, Padova ~ Italy*

Keywords: gastric ulcers, post mortem inspection, fattening pigs

## Riassunto

Lo studio ha avuto come obiettivo quello di valutare attraverso la rilevazione al macello, l'incidenza delle ulcere gastriche a livello di pars oesophagea (OGU) nel suino pesante Italiano. Questa tecnopatia infatti ha effetti rilevanti in termini di mortalità degli animali e potenziali perdite in termini di prestazioni produttive nei soggetti subclinici. Sono stati controllati 228 lotti per un totale di 22551 stomaci. Le lesioni sono state classificate utilizzando il metodo a punteggi che prevede una scala di 4 valori da 0, nessuna lesione a 3, ulcere gravi. Tutte le partite controllate sono state interessate da lesioni anche se con prevalenze e gravità molto diverse da lotto a lotto (0: media 17.1% max 85% min 0%; 3: media 4.1% max 35.6% min 0%). Se nell'analisi dei dati viene incluso l'effetto allevamento anche in questo caso si osservano forti differenze da azienda ad azienda. I risultati di questa ricerca confermano da un lato la rilevanza del problema delle ulcere gastriche negli allevamenti di suini dall'altro l'estrema variabilità di situazioni (tra lotti e tra allevamenti). Sulla base di queste considerazioni si evidenzia la necessità di associare alle rilevazioni al macello una accurata analisi retrospettiva dei fattori che possono aver determinato il loro sviluppo sia durante il periodo di allevamento, ma anche durante le fasi di carico, trasporto e attesa in pre-macellazione.

## Abstract

The study aimed to evaluate, through a post mortem inspection at the slaughterhouse the incidence of gastric ulcers at the level of pars oesophagea (OGU) in the Italian heavy pig. Gastric ulcers have important effects in terms of animal mortality and can cause potential losses in terms of production performance in sub-clinical subjects. In the study 228 batches lots for a total of 22551 stomachs have been checked. The lesions were classified using a scoring system with four values from 0 (no lesions) to 3 (severe ulcers). All batches checked had lesions although with a wide range of prevalence and severity (0: mean 17.1% max 85% min 0%; 3: mean 4.1% max 35.6% min 0%). Similarly, when farm effect was considered, strong differences in prevalence and severity of gastric lesions among farms were observed. The results of the present research confirm, on one hand the importance of the problem of gastric ulcers in pig farms on the other the extreme variability of situations (especially considering the effects of batch and farm). Therefore it is necessary to associate the control at the slaughter to an accurate retrospective analysis of the factors that could have determined these situations during the rearing phase, load, transport and lairage at the slaughterhouse.

## INTRODUZIONE:

Il tema delle ulcere gastriche a livello di pars oesophagea (OGU) nel suino non è una problematica nuova. La letteratura scientifica infatti annovera lavori pubblicati a partire prevalentemente dagli anni 90. Tuttavia questo argomento di ricerca continua a rivestire un forte interesse per le rilevanti ricadute zoo-economiche e per le implicazioni di salute e benessere animale. Le OGU infatti si presentano talora in modo subdolo e imprevedibile e possono

portare a morte gli animali. Stime non ufficiali riportano un tasso di mortalità associato alle OGU tra il 3 e il 4,5 % della mortalità totale [5]. In molti casi tuttavia non vi è una sintomatologia evidente e quindi si ha spesso a che fare con una forma subclinica della patologia per cui anche se gli animali non muoiono, soffrono, manifestano una crescita più ridotta si alimentano e bevono con difficoltà. Le OGU nei suini sono da considerare una tecnopatia, ossia una patologia indotta dalle condizioni di allevamento e la cui manifestazione è legata in modo trasversale ad aspetti zootecnici (alimentazione e tecniche di allevamento), clinico-terapeutici, genetici e manageriali. Larga parte delle bibliografia esistente si concentra su prove sperimentali che mettono a confronto due tesi alimentari (ad esempio distribuzione di diverse quantità di alimento, forma fisica della dieta somministrata, modalità di somministrazione della razione) ma nessuno studio ha un carattere epidemiologico e tale da mettere in relazione incidenza di OGU con diversi regimi alimentari. Inoltre, anche se l'alimentazione riveste un ruolo molto importante nella manifestazione delle ulcere, altri fattori potenzialmente predisponenti come i trattamenti clinico-terapeutici, la genetica e il management non hanno finora trovato spazio nella ricerca ma meritano di essere considerati e studiati per attuare una adeguata strategia di prevenzione e di controllo delle OGU. Va inoltre sottolineato come dall'esame della bibliografia, siano limitatissimi gli studi che considerano in modo specifico il problema delle OGU nel suino pesante ([1], [2] [3]) cioè quello allevato in Italia e destinato alla produzioni di DOP quali, ad esempio, il prosciutto di Parma e quello di San Daniele. Il suino pesante presenta delle tecniche di allevamento specifiche, che prevedono ad esempio un prolungamento del ciclo di ingrasso e l'utilizzo di linee genetiche dedicate. Queste differenze inducono ragionevolmente ad ipotizzare che i fattori di rischio per l'insorgenza di ulcere siano potenzialmente diversi da quelli identificati per il suino leggero. Scopo principale del presente lavoro stato quello di monitorare la prevalenza di ulcere gastriche nel suino pesante Italiano mediante una ispezione in post-mortem in sede di macellazione.

#### **MATERIALI E METODI:**

Il lavoro di raccolta dati sulle lesioni a livello di pars oesophagea, si è svolto presso un macello con sede in Emilia Romagna, struttura presso la quale vengono macellati suini pesanti provenienti dal Nord Italia. I dati sulle lesioni gastriche sono stati raccolte in 14 giornate di presenza al macello distribuite tra marzo e settembre 2015. La rilevazione iniziava alle ore 6 e terminava intorno alle 16. Nelle 14 giornate di presenza al macello sono stati controllati complessivamente 228 lotti, con una media di 16 per giorno. Ogni lotto di suini era tracciabile mediante indicazione del nome e del codice dell'allevamento di provenienza. Gli allevamenti coinvolti nella ricerca sono stati 120, di cui 45 sono stati campionati almeno 2 volte, ma sempre in giornate diverse. Ogni lotto aveva in media 135 capi e di questi circa 100 (max 115 e min 44) venivano ispezionati. Complessivamente nel corso dello studio sono state rilevate le lesioni di 22551 stomaci. Il controllo degli stomaci per la rilevazione delle lesioni è stato eseguito sempre dallo stesso osservatore, formato attraverso la consultazione di materiale fotografico e mediante un training al macello sotto la supervisione di un veterinario con esperienza nella valutazione delle lesioni gastriche. Ogni stomaco sottoposto alla valutazione delle lesioni veniva aperto lungo la grande curvatura e ripulito della maggior parte del contenuto gastrico (getto d'acqua a temperatura ambiente) da una specifica strumentazione presente al macello. Il tempo a disposizione per il controllo era imposto dalla velocità della catena di macellazione ed era di circa 7-10 secondi per stomaco. Le lesioni sono state classificate utilizzando il metodo a punteggi proposto da altri autori [3] e [6] che prevede una scala di 4 valori: 0, Nessuna lesione presente, mucosa liscia e di colore biancastro; 1, Ipercheratosi. La mucosa si presenta ispessita; 2, Erosioni e/o lievi ulcere con esteso sfaldamento dell'epitelio; 3, Ulcere gravi. Ogni stomaco è stato inoltre valutato per la presenza o assenza di lesioni ci-

catriziali. I dati di tutti i lotti (228) sono stati elaborati mediante analisi della varianza (PROC GLM di SAS) utilizzando un modello che ha considerato l'effetto del tempo di digiuno in relazione al tempo di attesa dopo lo scarico al macello (no digiuno prolungato quindi animali scaricati e avviati alla macellazione vs si digiuno prolungato – scarico nel tardo pomeriggio e macellazione il mattino seguente), il mese di macellazione e la relativa interazione. Una seconda analisi è stata effettuata considerando anche l'effetto allevamento includendo quelle aziende che avevano almeno 2 partite controllate (156 lotti e 45 allevamenti).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Le percentuali (medie, massime e minime) di stomaci attribuite alle diverse classi di punteggio e la percentuale di stomaci con cicatrici sono riportate in Tabella 1. Come si può osservare esiste una forte variabilità legata al lotto per tutte le categorie di punteggio, va comunque sottolineato come nessuna delle partite controllate sia risultata completamente priva di lesioni. Il punteggio 0, ossia quello che corrisponde all'assenza di lesioni, è stato attribuito infatti al massimo all'84.9% degli stomaci in una partita: questo significa che almeno il 15 % degli stessi presentavano lesioni. Il punteggio 3 che caratterizza le ulcere gravi, interessa più del 20% degli stomaci nel 3.1 % dei lotti esaminati. Per quanto riguarda la presenza di cicatrici, dato che fornisce informazioni utili sulla prevalenza di ulcere croniche o di lesioni ormai guarite, il 7,46% dei lotti considerati aveva meno dell'1% degli stomaci interessati dalla presenza di cicatrici ma ci sono lotti in cui queste alterazioni della mucosa hanno interessato oltre il 50% degli stomaci esaminati. I dati ottenuti confermano la grande diffusione del problema delle ulcere gastriche nel suino pesante Italiano. Queste percentuali sono comparabili a quelle ottenuti da altri autori [3] e [6] che hanno utilizzato gli stessi criteri di valutazione anche se in contesti diversi. Dai dati raccolti emerge inoltre come la presenza di ulcere sia influenzata dal tempo di digiuno al quale sono esposti gli animali prima della macellazione e dal mese di macellazione. In particolare quando il tempo di attesa al macello si prolunga (dal tardo pomeriggio al mattino seguente) si osserva che la percentuale di stomaci privi di lesioni si riduce (5.6 vs 9.8,  $P < 0.001$ ) mentre aumenta significativamente quella con lesioni di tipo 2 (19.9 vs 13.8,  $P < 0.001$ ). Questo dato è in linea con quanto riportato da altri autori [4] e [7] che avevano evidenziato punteggi più elevati di lesioni gastriche conseguenti a periodi di digiuno prolungato prima della macellazione. Anche il mese di macellazione sembra avere un effetto sull'incidenza delle lesioni gastriche. In particolare nel periodo giugno-agosto sembrano aumentare percentualmente gli stomaci con punteggio 1 e con cicatrici. Risultati simili purtroppo non sono comparabili con dati presenti in bibliografia, tuttavia l'aumento delle lesioni lievi nel periodo estivo potrebbe essere legata alle fasi di movimentazione e trasporto effettuate con temperature ambientali più elevate. La maggior presenza di cicatrici può essere ricondotta a fattori predisponenti presenti in allevamento. Se nell'analisi dei dati viene incluso l'effetto allevamento (156 lotti e 45 allevamenti) anche in questo caso si osservano forti differenze da azienda ad azienda (Figura 1). Ad esempio considerando il punteggio zero ci sono allevamenti nei quali la percentuale di stomaci senza lesioni è prossima allo zero altri nei quali questo valore supera il 60%. I risultati di questa ricerca confermano da un lato la rilevanza del problema delle ulcere gastriche nel suino, dall'altro l'estrema variabilità di situazioni soprattutto quando si considera l'effetto dell'allevamento. Per tali ragioni si evidenzia la necessità di associare al controllo al macello una accurata analisi retrospettiva dei fattori che possono aver determinato la formazione delle lesioni gastriche lungo tutta la filiera di produzione del suino pesante Italiano a partire dalla periodo di allevamento ma senza trascurare le fasi di carico, trasporto e attesa in pre-macellazione.

**Tabella 1:** Percentuale media, massima e minima di stomaci riportata per ciascuna classe di punteggio delle lesioni o per presenza di cicatrici.

**Table 1:** Mean, maximum and minimum percentage of stomachs for each class of lesion score and for presence of scars.

|         | Punteggio 0  | Punteggio 1 | Punteggio 2 | Punteggio 3 | Presenza di cicatrici |
|---------|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------------|
|         | % di stomaci |             |             |             |                       |
| media   | 17.1         | 62.4        | 16.5        | 4.1         | 12.6                  |
| massimo | 85.0         | 91.1        | 46.2        | 35.6        | 52.0                  |
| minimo  | 0            | 11.3        | 0           | 0           | 0                     |

**Tabella 2.** Percentuale di stomaci ripartiti per classe di punteggio o per la presenza di ulcere cicatrizzate in relazione al tempo di digiuno prima della macellazione.

**Table 2:** Mean percentage of stomachs for each class of lesion score and for presence of scars according to time of fasting.

|                 |              | digiuno prolungato |      | RSME  | Sign. |
|-----------------|--------------|--------------------|------|-------|-------|
|                 |              | No                 | Si   |       |       |
| punteggio 0     | % di stomaci | 9.8                | 5.6  | 2.68  | ***   |
| punteggio 1     | “            | 60.2               | 63.7 | 14.36 | ns    |
| punteggio 2     | “            | 13.8               | 19.9 | 8.72  | ***   |
| punteggio 3     | “            | 2.8                | 2.8  | 2.19  | ns    |
| cicatrici       | “            | 5.9                | 6.2  | 2.15  | ns    |
| punteggio medio |              | 0.99               | 1.00 | 0.13  | ns    |

ns: P>0.05; \*\*\*: P<0.001

**Tabella 3.** Percentuale di stomaci ripartiti per classe di punteggio o per la presenza di ulcere cicatrizzate in relazione al mese di macellazione.

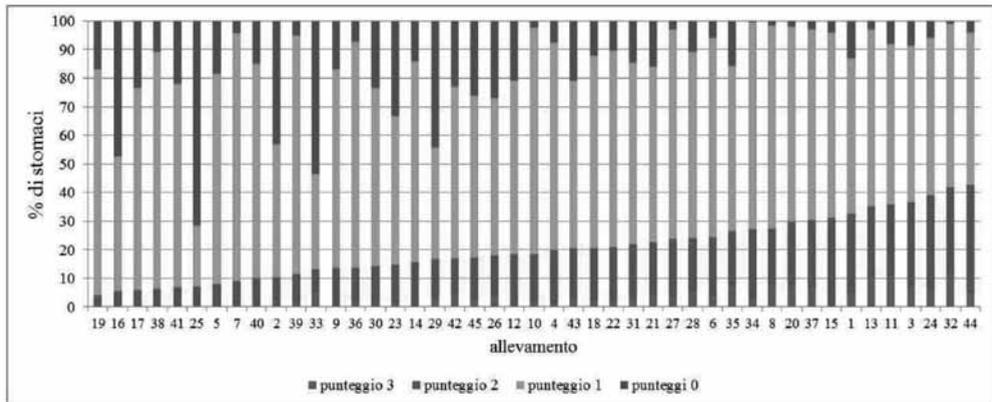
**Table 3:** Mean percentage of stomachs for each class of lesions score and for presence of scars according to month of slaughter.

|                              |              | mese di macellazione |                    |                    |                    |                   |                   |                    | RSME  | Sign. |
|------------------------------|--------------|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------|-------|
|                              |              | 3                    | 4                  | 5                  | 6                  | 7                 | 8                 | 9                  |       |       |
| punteggio 0                  | % di stomaci | 10.7                 | 7.9                | 6.1                | 7.6                | 5.7               | 8.2               | 6.5                | 2.68  | ns    |
| punteggio 1                  | “            | 50.3 <sup>b</sup>    | 60.4 <sup>ab</sup> | 59.2 <sup>ab</sup> | 66.2 <sup>a</sup>  | 68.1 <sup>a</sup> | 65.3 <sup>a</sup> | 64.0 <sup>ab</sup> | 14.36 | ***   |
| punteggio 2                  | “            | 17.4 <sup>ab</sup>   | 17.6 <sup>ab</sup> | 21.3 <sup>a</sup>  | 14.9 <sup>ab</sup> | 14.6 <sup>b</sup> | 12.7 <sup>b</sup> | 19.3 <sup>ab</sup> | 8.72  | ***   |
| punteggio 3                  | “            | 4.8 <sup>a</sup>     | 3.0 <sup>ab</sup>  | 3.4 <sup>a</sup>   | 1.9 <sup>b</sup>   | 2.5 <sup>ab</sup> | 2.5 <sup>ab</sup> | 2.2 <sup>ab</sup>  | 2.19  | *     |
| cicatrici                    | “            | 3.6 <sup>b</sup>     | 4.8 <sup>b</sup>   | 7.4 <sup>a</sup>   | 6.5 <sup>ab</sup>  | 7.2 <sup>a</sup>  | 7.7 <sup>a</sup>  | 6.6 <sup>ab</sup>  | 2.15  | **    |
| punteggio medio <sup>1</sup> |              | 0.98                 | 1.00               | 1.03               | 0.91               | 1.03              | 1.00              | 1.03               | 0.13  | ns    |

ns: P>0.05; \*: P<0.05; \*\*: P<0.01 \*\*\*: P<0.001

**Figura 1.** Percentuale di stomaci ripartiti per classe di punteggio in relazione all'allevamento di provenienza.

**Figure 2:** Mean percentage of stomachs for each class of lesions score according to farm of origin of the animals.



#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Appino S., Guarda F., Pregel P., Amedeo S., Cutufia M. A., Bellonio G., Ponzetto A. (2006). Detection of helicobacter candidatus suis by PCR in oesophago-gastric ulcers of swine in Italy. *Acta Vet Hung*, 54 (4), 517-524. *Acta Vet. Hung.* 54, 4: 517-524.
2. Binanti D., Benedetti V., Masnada W., Rondena M., Vezzoli F., Riccaboni, P. (2012) Pathological findings and detection of faecal occult blood as indicator of presence of gastroesophageal ulcer in growing pigs. *Large Anim. Rev.*, 18, 6, 305-309.
3. Di Martino G., Capello K., Scollo A., Gottardo F., Stefani A. L., Rampin F., Schiavon E., Marangon S., Bonfanti L. (2013). Continuous straw provision reduces prevalence of oesophago-gastric ulcer in pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs). *Res. Vet. Sci.*, 95, 3: 1271-1273 <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.012> 2013
4. Lawrence B. V., Anderson D. B., Adeola O., Cline T. R., (1998). Changes in pars esophageal tissue appearance of the porcine stomach in response to transportation, feed deprivation, and diet composition. *J. Anim. Sci.*, 76, 3, 788-795.
5. Melnichouk S. I. (2002). Mortality associated with gastric ulceration in swine. *Can. Vet. J.*, 43, 3, 223-225.
6. Robertson I. D., Accioly J. M., Moore K. M., Driesen S. J., Pethick D. W., Hampson, D. J. (2002). Risk factors for gastric ulcers in australian pigs at slaughter. *Prev. Vet. Med.*, 53, 4, 293-303.
7. Swaby H., Gregory N.G. (2012). A note on the frequency of gastric ulcers detected during post-mortem examination at a pig abattoir. *Meat Sci.*, 90, 1, 269-271.



# EFFETTO DI INDUZIONE ED ASSISTENZA DEL PARTO SULLE PERFORMANCE DI SCROFA E NIDIATA

MAZZONI C.<sup>[1]</sup>, SCOLLO A.<sup>[1]</sup>, TAVELLA G.<sup>[1]</sup>, CASAPPA P.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*Ceva Salute Animale ~ Agrate Brianza ~ Italy*

Keywords: Farrowing induction, Farrowing assistance, Alfaprostol

## Riassunto

L'induzione dei parti rappresenta una pratica che può offrire vantaggi per l'allevamento sotto il profilo zootecnico e manageriale. Un'adeguata assistenza al parto dovrebbe mirare alla riduzione del numero di suinetti nati morti, alla limitazione di fenomeni di cannibalismo e degli schiacciamenti, e al supporto ai neonati disvitali. Nel presente lavoro è stato indagato l'effetto di un protocollo di induzione con Alfaprostol e dell'influenza di un'assistenza specializzata ai parti indotti su parametri produttivi di scrofa e nidiata, rispetto a parti non indotti e non assistiti. Lo studio ha raccolto informazioni su 158 parti così suddivisi: 53 parti non indotti e non assistiti (Controllo), 63 parti indotti e assistiti (Alfaprostol con assistenza) e 42 parti indotti e non assistiti (Alfaprostol senza assistenza). L'assistenza intesa come intervento ostetrico e farmacologico sulla scrofa e supporto ai suinetti neonati è stata garantita da un veterinario formato. Sono stati registrati parametri produttivi relativi al parto e l'andamento della mortalità nella nidiata nei primi 3 giorni. Rispetto al gruppo Controllo si è osservata una ridotta natimortalità ( $\Delta = 2,88\%$ ,  $P = 0,001$ ), un minor numero di perdite per schiacciamento ( $\Delta = 2,98\%$ ,  $P < 0,05$ ) e perdite nelle prime 24 ore ( $\Delta = 3,23\%$ ,  $P < 0,05$ ) per i parti indotti con Alfaprostol. L'effetto dell'assistenza si è dimostrato indispensabile per la diminuzione della natimortalità e per limitare le perdite il primo giorno. Non si sono evidenziate differenze significative tra i gruppi per gli altri parametri considerati. In conclusione, l'induzione dei parti può contribuire al miglioramento di alcuni parametri produttivi della sala parto, specialmente se seguita da un valido protocollo di assistenza a scrofa e suinetti nel periparto.

## Abstract

Induction of farrowing is a useful practice both from management and zootechnical point of view. An appropriate farrowing supervision should aim to: decrease the number of stillbirths, reduce cannibalised or crushed piglets and facilitate newborn survival. In this study the effect of farrowing induction by Alfaprostol administration on the performance of sows and litters has been investigated, as long as the influence of farrowing supervision by qualified staff. Data have been collected from 158 sows sorted in three groups: 53 not induced and not assisted-farrowings (Control), 63 induced and assisted farrowings (Alfaprostol with assistance) and 42 induced but not assisted farrowings (Alfaprostol without assistance). Supervision as obstetric manipulation or drug administration to the sow and support to the newborn piglets has been provided by a trained veterinarian. Productive data and piglet mortality throughout the first five days of life have been recorded. Alfaprostol groups showed a decrease in stillbirth rate ( $\Delta = 2,88\%$ ,  $p = 0,001$ ), number of crushed piglets ( $\Delta = 2,98\%$ ,  $p < 0,05$ ) and mortality within the first 24 hours ( $\Delta = 3,23\%$ ,  $P < 0,05$ ) compared to the Control group. Farrowing supervision seems to be essential to guarantee positive effects on stillbirth rate and piglet losses on the day of birth. In conclusion, farrowing induction may contribute in improving some productive parameters, especially if supported with a specialised peri partum assistance to the sow and litter.

## **INTRODUZIONE:**

Nella maggior parte delle aziende, l'obiettivo principale dell'induzione al parto è permettere una più attenta ed accurata supervisione della scrofa in travaglio e dei neonati grazie alla sincronizzazione dei parti in orario lavorativo. Non va comunque sottovalutato il vantaggio di poter programmare i parti nei giorni infrasettimanali, di gestire al meglio i baliaggi, e di poter svezzare lo stesso giorno il maggior numero di suinetti della stessa età (13; 12). L'induzione al parto nella scrofa viene solitamente effettuata somministrando il giorno prima del parto le prostaglandine, siano esse di origine naturale (PGF<sub>2α</sub>) oppure analoghi sintetici come l'Alfaprostol. Altri ormoni, come ad esempio l'ossitocina, possono essere somministrati per completare il protocollo di induzione (7) con un effetto sincronizzante. Nell'ultima decade la ricerca scientifica ha esplorato ed approfondito diversi aspetti riproduttivi e produttivi legati all'induzione al parto, come ad esempio gli effetti su peso alla nascita e vitalità dei suinetti (12), mortalità e accrescimenti durante la lattazione (4), fino ad arrivare allo studio delle alterazioni della concentrazione di prolattina e della composizione del colostro nelle scrofe (3). L'importanza di poter assistere i parti indotti e sincronizzati è stata evidenziata già da Dziuk (2) e successivamente da Holyoake e Dial (5), che hanno osservato una importante riduzione della mortalità pre-svezzamento quando l'assistenza era garantita. Martel et al. (9) ha inoltre rilevato una correlazione positiva tra produttività della scrofa e assistenza, intesa come intervento manuale e farmacologico mirato. La supervisione frequente dei parti e il sostegno ai suinetti in difficoltà diminuisce anche il rischio di sindrome da disgalassia post partum rispetto a parti non assistiti (11). In sala parto la natimortalità è la prima rilevante causa di perdita, e si ritiene dovuta principalmente ad una sospensione dell'apporto di ossigeno al feto al momento del parto, determinata per lo più da incremento delle contrazioni uterine, occlusione o rottura del cordone ombelicale, o prematuro distacco delle membrane fetali. Lo stato di ipossia dei feti è stato correlato all'imbrattamento da meconio dei suinetti neonati, che diviene utile elemento per valutare la necessità di un intervento ostetrico. Sui suinetti nati vivi il 50% delle perdite in lattazione si concentra nelle prime 72 ore dopo il parto, e di queste fino all'80% è causato da denutrizione e schiacciamento (8), entrambi aspetti su cui la presenza e l'intervento di un operatore formato può fare la differenza. Scopo del presente lavoro è stato valutare l'effetto dell'induzione al parto tramite l'utilizzo di un analogo di sintesi delle prostaglandine (Alfaprostol) e contestualmente l'influenza di un'assistenza mirata sui parti indotti, valutando sia le performance della scrofa durante il parto sia i dati produttivi dei suinetti nei primi cinque giorni di vita.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali e management**

lo studio è stato condotto in una scrofaia intensiva di tipo convenzionale localizzata nel nord-est italiano, ed è iniziato ad aprile per terminarsi in luglio. Sono rientrate nella prova 158 scrofe di genetica ibrida tra il secondo ed il decimo parto, per un totale di 1899 suinetti nati. Le scrofe, alloggiato in gabbie parto convenzionali e gestite con le procedure standard aziendali, sono state suddivise in due gruppi di trattamento equilibrandone all'interno gli ordini di parto: gruppo controllo (n = 53 scrofe), che non ha ricevuto alcun trattamento farmacologico volto all'induzione del parto; gruppo Alfaprostol (n = 105 scrofe), che ha ricevuto per via intramuscolare 2 mg di Alfaprostol (1 ml di Gabbrostim<sup>®</sup>, come da dose raccomandata). Il trattamento induttivo, ove previsto, è stato effettuato 24 ore prima della data prevista del parto; la mattina del giorno previsto del parto è stata inoltre somministrata ossitocina alle scrofe precedentemente trattate con Alfaprostol che non avevano ancora iniziato il travaglio. Le scrofe del gruppo indotto che hanno partorito durante le ore lavorative sono state assistite da un veterinario formato e specializzato. A tal fine erano predisposte schede individuali per ogni

scrofa, su cui venivano sistematicamente annotati la nascita di nuovi suinetti (orario e numero), gli interventi esplorativi, gli interventi farmacologici. L'addetto all'assistenza compiva un giro di supervisione sulle scrofe partorienti, ripetendone il percorso in modo da garantire per ogni animale almeno un'osservazione ogni 30 minuti. Interveniva con un'esplorazione uterina nel caso di un eccessivo rallentamento del ritmo di espulsione dei feti, di un'evidente situazione di sofferenza fetale (imbrattamento da meconio, difficoltà respiratoria) o di contrazioni a vuoto, per indagarne la causa e risolvere eventuali distocie. Se ritenuto necessario effettuava trattamenti farmacologici mirati sulla scrofa. Le operazioni sui suinetti comprendevano la rianimazione dei neonati ipoossici, il riposizionamento vicino alla fonte di calore o alla mammella, per facilitarne il riscaldamento o l'alimentazione, fino alla colostratura forzata con sondino esofageo. La presenza dell'addetto all'assistenza consentiva inoltre di limitare i fenomeni di cannibalismo (confinamento dei suinetti per le prime ore dopo il parto) e di intervenire ove possibile al salvataggio degli schiacciati. Alla fine della giornata dei parti, un sommario baliaggio delle nidiate è stato effettuato entro gruppo di trattamento per pareggiare i suinetti nel numero e nella taglia. Parametri valutati Sono state valutate le performance di scrofa e nidiate: numero di suinetti nati vivi, numero totale di nati, numero di nati morti e di mummificati, e mortalità dei suinetti durante ciascuno dei primi tre giorni di vita e relativa causa di morte (morsicatura della scrofa, schiacciamento, inedia, diarrea, altro). Per la valutazione dell'asfissia perinatale, è stato registrato l'imbrattamento cutaneo da meconio e sangue per ciascun suinetto utilizzando una scala a tre livelli: 0 = assenza di meconio sulla cute del suinetto; 1 = tracce di meconio sulla cute del suinetto; 2 = evidente presenza di meconio sulla cute del suinetto. Analisi statistica L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando i programmi SAS (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) e XLSTAT (Addinsoft). La valutazione dei parametri registrati è stata effettuata per i due gruppi di osservazione di partenza (controllo, Alfaprostol); tuttavia una seconda analisi è stata effettuata separando le scrofe indotte e assistite dalle scrofe indotte ma non assistite in quanto partorienti durante le ore non lavorative. I gruppi di osservazione considerati nella seconda analisi sono stati dunque tre: controllo, Alfaprostol con assistenza e Alfaprostol senza assistenza. Il numero di nati morti e di mummificati, il numero di esplorazioni uterine ed il grado di imbrattamento cutaneo sono stati analizzati tramite il test non parametrico di Kruskal–Wallis. I dati relativi alla mortalità e alle cause della morte sono stati analizzati utilizzando il test del chi quadro. Per tutte le altre variabili è stata utilizzata la procedura ANOVA (Proc GLM).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

La prova ha avuto una durata di 12 settimane, con inizio alla fine di aprile e termine nei primi giorni di luglio. Durante l'intero periodo, la percentuale di scrofe che hanno partorito nelle ore lavorative a seguito di protocollo induttivo sono state il 69,5%. Le scrofe del gruppo Alfaprostol per le quali si è scelto l'ulteriore intervento farmacologico con ossitocina sono state il 49,2%. La percentuale di suinetti nati morti è stata maggiore nel gruppo controllo rispetto al gruppo indotto e assistito ( $7,09 \pm 6,68\%$  vs  $3,56 \pm 5,22\%$  per il gruppo Alfaprostol con assistenza;  $P = 0,001$ ), mentre il gruppo indotto ma non assistito ha mostrato la stessa mortalità del gruppo controllo ( $5,18 \pm 6,24\%$ ) (Figura 1). Nelle prime 24 ore la mortalità più elevata si è registrata nel gruppo controllo ( $5,40 \pm 9,0\%$ ;  $P = 0,003$ ) rispetto al gruppo Alfaprostol assistito ( $2,25 \pm 4,5\%$ ) ed al gruppo Alfaprostol non assistito ( $2,04 \pm 5,5\%$ ). Le cause più comuni di morte dei suinetti neonati sono state lo schiacciamento della scrofa e l'inedia ( $3,40 \pm 6,0$  e  $5,07 \pm 8,8$  rispettivamente,  $P < 0,001$ ) (Figura 2). Mentre per l'inedia però non si sono osservate differenze tra i gruppi, la percentuale più elevata di neonati schiacciati si è osservata nel gruppo controllo rispetto al gruppo Alfaprostol assistito ( $5,56 \pm 10,4$  vs  $2,58 \pm 4,7$ ,  $P = 0,048$ ). In generale, la distribuzione della mortalità è andata decrescendo allonta-

nandosi dalla data di nascita, rimanendo concentrata prevalentemente nei primi due giorni di vita. I risultati del presente lavoro confermano che l'Alfaprostol somministrato 24 ore prima della data prevista del parto è una molecola efficace ad indurre il parto nella scrofa. Il tasso di risposta al trattamento (69,5%) è stato anche superiore rispetto ai dati riportati da precedenti autori. Ad esempio Straw et al. (13) avevano ottenuto una media di parti avvenuti in un orario lavorativo molto simile a quello considerato nel presente lavoro (dalle ore 07.00 alle ore 14.30) che era compresa tra il 52,3% ed il 60,1% delle scrofe trattate con prostaglandina F<sub>2α</sub>. Mediamente comunque, la percentuale di scrofe sottoposte a protocollo induttivo che partoriscono nelle successive 8-12 ore lavorative varia da circa il 40% fino a superare il 90% (7), in accordo con i presenti risultati. L'adozione del protocollo induttivo ha abbassato la natimortalità rispetto al gruppo controllo. Questo risultato non sempre è supportato dalla bibliografia: infatti diversi autori non riportano alcuna differenza statistica della natimortalità osservata nel gruppo di controllo e nei gruppi indotti (12; 13; 6). Tuttavia, tali autori sottolineano la quasi completa assenza del personale specializzato che nel presente studio è stato destinato all'assistenza al parto. Osservando infatti i dati emerge come la diminuzione della natimortalità si osservi nettamente solo nel gruppo indotto ed assistito, mentre la mancanza di assistenza non faccia evidenziare un chiaro miglioramento rispetto al dato del gruppo controllo. D'altra parte è riportato in bibliografia come una corretta e specializzata assistenza al parto sia fondamentale nella riduzione della natimortalità durante il parto (10). A prescindere dal gruppo di trattamento, la più alta mortalità dei suinetti si è verificata nei primi due giorni di vita, in accordo con quanto approfonditamente descritto nella sua review da Alonso-Spilsbury et al. (1). Nello specifico, durante l'intero primo giorno di vita dei suinetti, l'induzione del parto ha determinato una riduzione della mortalità rispetto al gruppo controllo. Come per la natimortalità, anche l'analisi delle perdite legate al primo giorno di vita sembra essere influenzata dal fattore assistenza. Sempre nella sopracitata review, Alonso-Spilsbury et al. infatti sottolineano che il ruolo dell'operatore della sala parto non si limita alle esplorazioni uterine, bensì comprende anche la cura del neonato nelle prime ore di vita. Fondamentali sono infatti l'assistenza ai suinetti deboli e ai sottopeso, la liberazione delle vie aeree negli animali che nascono con difficoltà respiratorie dovute a sofferenza fetale, la somministrazione del colostro a coloro che non raggiungono il capezzolo, il salvataggio degli animali schiacciati ed il riscaldamento aggiuntivo con lampade e materiale assorbente per gli animali in difficoltà. A conferma di ciò, l'analisi della mortalità ha visto la diminuzione del numero di animali schiacciati nel gruppo indotto, rispetto al gruppo controllo. La mortalità da schiacciamento è scesa da 5,56% ± 10,4 del gruppo controllo fino a livelli inferiori rispetto ai range di normalità indicati in bibliografia per il gruppo Alfaprostol, con differenza statistica (2,58% ± 4,7; range di riferimento: da 4,8 a 18%, Alonso-Spilsbury et al., 2007).

In conclusione, l'Alfaprostol è una molecola efficace per la buona induzione al parto delle scrofe. La sincronizzazione del parto ha avuto lo scopo principale di permettere una buona assistenza al parto, che ha visto come risultato la riduzione della natimortalità e della mortalità durante le prime 24 ore, in particolare dovuta a schiacciamento. È giusto precisare che la mancanza di assistenza nel gruppo Alfaprostol non ha determinato un peggioramento dei parametri rispetto al gruppo controllo. Dallo studio emerge come un'accurata scelta del momento dell'induzione non aumenti il rischio di nascita di suinetti disvitali. Parallelamente, la scelta di garantire un'adeguata assistenza al parto rappresenta un valore aggiunto all'intervento farmacologico e un fattore determinante per il miglioramento dei rendimenti della sala parto.

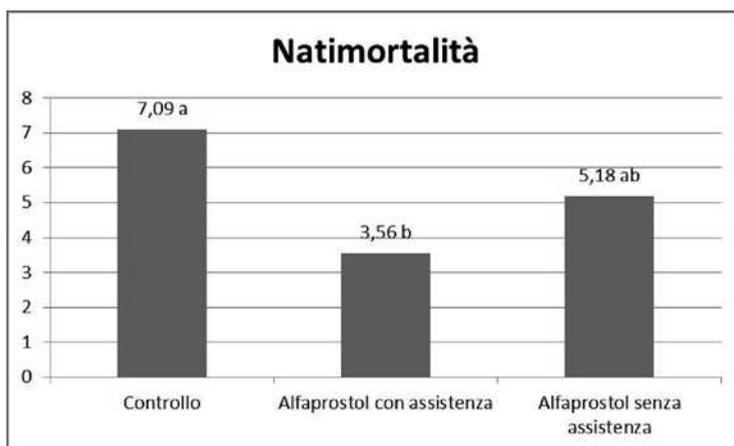


Figura 1. Percentuale di nati morti per ciascun gruppo di trattamento (P 0,001). a, b: lettere diverse indicano differenza statistica

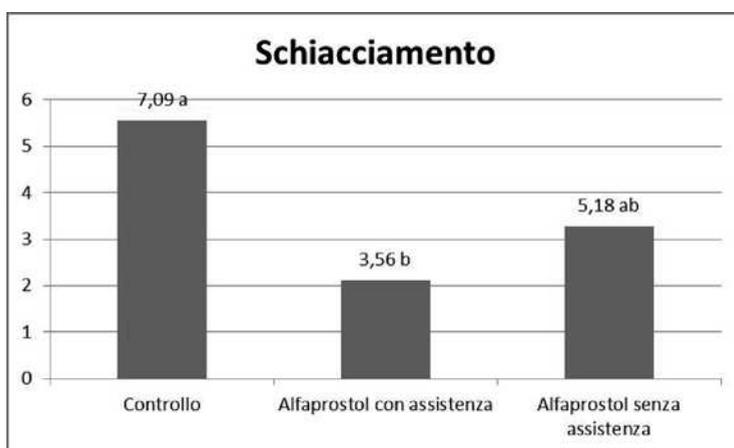


Figura 2. Percentuale di suinetti morti schiacciati per ciascun gruppo di trattamento (P 0,001). a, b: lettere diverse indicano differenza statistica

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Alonso-Spilsbury, M., Ramirez-Necoechea, R., González-Lozano, M., Mota-Rojas, D., & Trujillo-Ortega, M. E. (2007). Piglet survival in early lactation: a review. *J. Anim. Vet. Adv*, 6(1), 76-86.
2. Dziuk P.J. (1979). Control and mechanisms of parturition in the pig. *An. Repr. Sci.* 2,335-342.
3. Foisnet, A., Farmer, C., David, C., & Quesnel, H. (2011). Farrowing induction induces transient alterations in prolactin concentrations and colostrum composition in primiparous sows. *Journal of animal science*, 89(10), 3048-3059.
4. Gunvaldsen, R. E., Waldner, C., & Harding, J. C. (2007). Effects of farrowing induction on suckling piglet performance. *J. Swine Health Prod*, 15(2), 84-91.
5. Holyoake P.K., Dial G.D., Trigg T., King V.L. (1995) Reducing pig mortality through su-

- pervision during the perinatal period. *J Anim Sci.* 73:3543– 3551.
6. Kaeoket, K. (2006). The Effect of Dose and Route of Administration of R-cloprostenol on the Parturient Response of Sows. *Reproduction in domestic animals*, 41(5), 472-476.
  7. Kirkden, R. D., Broom, D. M., & Andersen, I. L. (2013). Piglet mortality: the impact of induction of farrowing using prostaglandins and oxytocin. *Animal reproduction science*, 138(1), 14-24.
  8. Kirkwood R.N. et al. (2000). *Reproductive Management of Pigs. Guides and Problem-Solving.* SUS Multimedia Publications, 311 Victoria st.-West Melbourne, Australia 3003.
  9. Martel G., Dourmad J.Y, Dedieu B., 2008. Do labour productivity and preferences about work load distribution affect reproduction management and performance in pig farms. *Livest Sci* 116:96-107.
  10. Nguyen, K., Cassar, G., Friendship, R. M., Dewey, C., Farzan, A., & Kirkwood, R. N. (2011). Stillbirth and preweaning mortality in litters of sows induced to farrow with supervision compared to litters of naturally farrowing sows with minimal supervision. *J Swine Health Prod*, 19(4), 214-217.
  11. Papadopoulos G.A., Vanderhaeghe C, Janssens G.P.J., Dewulf J., Maes D.G.D., 2010. Risk factors associated with postpartum dysgalactia syndrome in sows. *Vet J* 184:167-171
  12. Sanchez-Aparicio, P., Mota-Rojas D, D., Trujillo-Ortega, M. E., Zarco-Quintero, L. A., Becerril-Herrera, M., Alonso-Spilsbury, M., & Alfaro-Rodriguez, A. (2009). Effect of prostaglandins for inducing birth on weight, vitality and physiological response in newborn pigs. *Journal of Applied Animal Research*, 36(1), 113-118.
  13. Straw, B., Bates, R., & May, G. (2008). Influence of method of administration of prostaglandin on farrowing and relationship between gestation length and piglet performance. *Journal of Swine Health and Production*, 16(3), 138.

# IL MONITORAGGIO DELLE LESIONI AL MACELLO COME STRUMENTO SANITARIO SU BASE STAGIONALE

SCOLLO A.<sup>[1]</sup>, AMORICO A.<sup>[1]</sup>, CONTIERO B.<sup>[2]</sup>, GOTTARDO F.<sup>[2]</sup>, SALVINI F.<sup>[3]</sup>, VELOCI M.<sup>[1]</sup>, MAZZONI C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*Università degli Studi di Padova ~ Legnaro ~ Italy*,  
<sup>[3]</sup>*PigVet ~ Brescia ~ Italy*

Keywords: Slaughter, Lesions, Seasonality

## Riassunto

Alcuni Paesi europei hanno adottato un sistema di monitoraggio degli animali in sede di macellazione valutandone le lesioni macroscopiche dei visceri. In Italia, una simile iniziativa è stata implementata dall'industria suinicola nel 2014. Il sistema registra una serie di lesioni patologiche tramite l'ispezione di polmoni, pleure e fegato. Il presente lavoro ha lo scopo di fornire una visione stagionale delle lesioni osservate e le correlazioni tra le lesioni ed i principali parametri climatici. I risultati hanno mostrato una netta differenza stagionale tra le lesioni, sottolineando l'importanza di avere dei parametri di riferimento stagionali. Le correlazioni emerse tra lesioni e parametri climatici hanno mostrato una maggiore incidenza di lesioni respiratorie nel caso di basse temperature ambientali la settimana precedente la macellazione; se invece le basse temperature erano presenti 13 settimane prima, erano le cicatrici le lesioni più evidenti.

## Abstract

Some European health schemes based on abattoir inspections provide an integrated system to optimize the postmortem detection and the reporting of pathological lesions. In Italy, a similar initiative has been implemented by the pig industry in 2014. These scheme record the presence of a range of pathological lesions detected by means of detailed inspection of lungs, pleura and liver of the slaughtered pigs. This paper aims to provide a seasonal overview of the lesions recorded, and correlations between lesions and climate parameters. Results showed a significant seasonal difference between lesions, highlighting the usefulness of seasonal reference ranges of the means. Correlation between lesions and climate parameters showed higher incidence of respiratory lesions when low temperature occurs the week before slaughter; if low temperature occurred 13 weeks before slaughter, scars were more relevant.

## INTRODUZIONE:

Negli ultimi anni, l'Italia si è approssiata al sistema di monitoraggio delle lesioni al macello esattamente come già altri Paesi europei avevano fatto negli anni precedenti. Dopo i primissimi tentativi danesi negli anni 80 (15) ed olandesi negli anni 90 (4), il più sviluppato ed integrato esempio di controllo degli animali in sede di macellazione è forse quello inglese, iniziato nel 2005 con il BPEX Pig Health Scheme (BPHS) (9). Questo sistema di monitoraggio registra la presenza e la gravità di svariate lesioni dei visceri in sede di ispezione post mortem dei suini clinicamente sani inviati al macello e destinati al consumo umano. Le lesioni osservate sono solitamente associate a patologie che notoriamente causano una riduzione delle performance degli animali. Il sistema di monitoraggio fornisce un importante feedback dal macello all'allevamento con lo scopo di mettere a conoscenza a monte del ciclo di produzione ciò che spesso è visibile solo a valle. È ormai consolidato che l'ispezione al macello è un utile strumento sia per l'allevatore, che per il monitoraggio delle patologie e per gli studi epidemiologici (10). La stessa Unione Europea pone tra le priorità della sua azienda migliorare la sorveglianza della

salute animale e l'identificazione di semplici ed affidabili indicatori di salute. Sulle orme di quanto già fatto in Italia dal gruppo di lavoro del dottor Dottori all'Istituto Zooprofilattico di Reggio Emilia (8), nel 2014 è partito un progetto che si è posto l'obiettivo di ricreare in Italia un sistema di monitoraggio delle lesioni al macello quanto più simile al modello estero. Sebbene nel corso dei mesi sia stato aggiunto il monitoraggio di molte altre lesioni (es. ulcere gastriche, rinite atrofica, lesioni della cute, indice di dermatite, pericarditi ecc.), le lesioni principali rimangono quelle a carico dei polmoni, delle pleure e del fegato. Questo perché i disordini respiratori così come la presenza di parassiti fegato sono tra le patologie con maggiore impatto economico nella moderna produzione suinicola (12; 13). Sebbene siano già stati condotti diversi studi su queste lesioni al macello, la bibliografia è particolarmente povera di indagini che considerino la stagionalità delle lesioni e la loro eventuale correlazione con i fattori climatici. Comprendere il modello temporale di una patologia e la conseguente espressione delle sue lesioni caratteristiche è invece un passo essenziale nella comprensione della sua epidemiologia. Non meno importante, poter avere dei ranges stagionali per ciascun tipo di lesione rappresenta uno strumento estremamente preciso a disposizione dell'allevatore che può evidenziare i punti forti e deboli della propria gestione sanitaria all'interno di ciascuna stagione. Scopo del presente lavoro è stato fornire i ranges stagionali delle lesioni a carico di polmoni, pleure e fegato, e verificare le eventuali correlazioni con i principali parametri climatici.

#### **MATERIALI E METODI:**

I dati utilizzati nel presente lavoro sono stati raccolti a partire da Settembre 2014 fino a Settembre 2015. Il monitoraggio degli animali è stato effettuato con cadenza settimanale in uno stabilimento dell'Emilia Romagna (Italcarni soc. coop. Agricola, OPAS) che macella in media circa 4500 animali al giorno. Sono state monitorate in totale 727 partite di suini pesanti (165 kg di peso e 9 mesi d'età), ciascuna rappresentata da circa 100 animali provenienti dalla stessa azienda. L'esame dei visceri di ciascun animale è stato condotto da due veterinari specializzati e formati ad attribuire il punteggio per ciascuna lesione in modo uguale, eliminando il rischio di differenze individuali. Le lesioni polmonari Mycoplasma-like sono state punteggiate utilizzando la griglia di Madec (6), attribuendo un punteggio da 0 a 4 per ciascun lobo a seconda della percentuale di tessuto polmonare colpito da lesione. Nella valutazione del tessuto polmonare di ciascun suino, sono stati inoltre segnalati con metodo binomiale (presenza/assenza) le cicatrici, gli ascessi, i consolidamenti tissutali da infezioni batteriche secondarie, e le lesioni a scacchiera indicative di probabile co-esistenza di virus e Mycoplasma. Le lesioni pleuriche sono state valutate utilizzando la griglia SPES (3), che attribuisce un punteggio da 0 a 4 a seconda dell'estensione e della localizzazione delle aderenze pleuriche. È stato poi calcolato l'indice APP secondo la formula suggerita dagli stessi autori. Sono stati inoltre registrati con metodo binomiale gli eventuali sequestri. Le lesioni del fegato sono state valutate utilizzando una scala da 1 a 3: 1 = nessuna lesione o meno di 3 lesioni; 2 = da 3 a 10 lesioni; 3 = più di 10 lesioni. Il valore medio di partita è stato dunque calcolato per ciascuna lesione. Per ciascuna partita sono stati registrati i parametri climatici (T° massima, T° minima, T° media, umidità %, sbalzo tra T° minima e massima, pressione atmosferica; Archivio Meteo Storico on-line ilmeteo.it) ottenuti dalla media dei dati delle regioni Emilia-Romagna, Lombardia e Veneto della settimana precedente la data di macellazione. Considerando che le lesioni macroscopiche attribuibili a *Mycoplasma hyopneumoniae* si risolvono in cicatrici in 12-14 settimane (7), anche i parametri climatici della 13<sup>a</sup> settimana precedente la data di macellazione sono stati registrati. Il programma statistico utilizzato per la valutazione degli atti è stato il SAS. Le statistiche descrittive delle lesioni sono state ottenute entro ciascuna stagione dell'anno, mentre l'analisi delle correlazioni è stato effettuato tra le lesioni ed i parametri climatici della settimana precedente la data di macellazione e di 13 settimane prima.

| Stagione                      | Variabile              | Media | Dgy. standard | Aziende molto problematiche | Aziende moderatamente problematiche | Aziende poco problematiche | Aziende migliori |
|-------------------------------|------------------------|-------|---------------|-----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|------------------|
| <b>Autunno</b><br>(n = 161)   | <b>Polmoni</b>         |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Assenza di lesioni (%) | 34,04 | 16,44         | 6,8 - 22                    | 22 - 31,6                           | 31,6 - 41,9                | 41,9 - 98        |
|                               | Punteggio medio        | 2,08  | 1,04          | 0,17 - 1,34                 | 1,34 - 2                            | 2 - 2,62                   | 2,62 - 7,36      |
|                               | Cicatrici (%)          | 14,17 | 9,62          | 0 - 6,1                     | 6,1 - 12,7                          | 12,7 - 20                  | 20 - 47,7        |
|                               | <b>Pleure</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Punteggio medio        | 0,84  | 0,51          | 0 - 0,42                    | 0,42 - 0,78                         | 0,78 - 1,24                | 1,24 - 2,42      |
|                               | Indice APP             | 0,75  | 0,50          | 0 - 0,35                    | 0,35 - 0,67                         | 0,67 - 1,12                | 1,12 - 2,27      |
|                               | <b>Fegato</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
| Lesioni gravi (%)             | 7,59                   | 8,42  | 0 - 2,3       | 2,3 - 5,7                   | 5,7 - 9,5                           | 9,5 - 64,6                 |                  |
| Punteggio medio               | 1,28                   | 0,23  | 1,03 - 1,12   | 1,12 - 1,22                 | 1,22 - 1,35                         | 1,35 - 2,55                |                  |
| <b>Estate</b><br>(n = 215)    | <b>Polmoni</b>         |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Assenza di lesioni (%) | 44,65 | 14,72         | 5,3 - 35,7                  | 35,7 - 44,1                         | 44,1 - 54,4                | 54,4 - 88,7      |
|                               | Punteggio medio        | 1,58  | 0,95          | 0,18 - 0,98                 | 0,98 - 1,37                         | 1,37 - 1,77                | 1,77 - 5,71      |
|                               | Cicatrici (%)          | 15,95 | 9,83          | 0 - 8,1                     | 8,1 - 13,8                          | 13,8 - 22                  | 22 - 45,5        |
|                               | <b>Pleure</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Punteggio medio        | 0,81  | 0,46          | 0,01 - 0,43                 | 0,43 - 0,78                         | 0,78 - 1,17                | 1,17 - 1,97      |
|                               | Indice APP             | 0,72  | 0,45          | 0 - 0,35                    | 0,35 - 0,67                         | 0,67 - 1,01                | 1,01 - 1,84      |
|                               | <b>Fegato</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
| Lesioni gravi (%)             | 10,25                  | 8,38  | 0 - 4,2       | 4,2 - 8                     | 8 - 13,8                            | 13,8 - 47,3                |                  |
| Punteggio medio               | 1,36                   | 0,21  | 1 - 1,22      | 1,22 - 1,32                 | 1,32 - 1,46                         | 1,46 - 2,23                |                  |
| <b>Inverno</b><br>(n = 177)   | <b>Polmoni</b>         |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Assenza di lesioni (%) | 33,41 | 16,26         | 4,1 - 22                    | 22 - 30,9                           | 30,9 - 42,6                | 42,6 - 82,6      |
|                               | Punteggio medio        | 2,12  | 1,00          | 0,2 - 1,38                  | 1,38 - 2,01                         | 2,01 - 2,7                 | 2,7 - 5,9        |
|                               | Cicatrici (%)          | 17,11 | 9,24          | 0 - 11                      | 11 - 15,85                          | 15,85 - 22,45              | 22,45 - 48,4     |
|                               | <b>Pleure</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Punteggio medio        | 0,95  | 0,50          | 0,04 - 0,61                 | 0,61 - 0,91                         | 0,91 - 1,31                | 1,31 - 2,3       |
|                               | Indice APP             | 0,86  | 0,49          | 0 - 0,49                    | 0,49 - 0,81                         | 0,81 - 1,19                | 1,19 - 2,24      |
|                               | <b>Fegato</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
| Lesioni gravi (%)             | 9,34                   | 7,42  | 0 - 4,1       | 4,1 - 7,1                   | 7,1 - 11,8                          | 11,8 - 46,3                |                  |
| Punteggio medio               | 1,33                   | 0,19  | 1,03 - 1,19   | 1,19 - 1,29                 | 1,29 - 1,41                         | 1,41 - 2,08                |                  |
| <b>Primavera</b><br>(n = 174) | <b>Polmoni</b>         |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Assenza di lesioni (%) | 39,56 | 14,65         | 6,3 - 31,1                  | 31,1 - 38,8                         | 38,8 - 47,1                | 47,1 - 86,6      |
|                               | Punteggio medio        | 1,84  | 0,97          | 0,26 - 1,2                  | 1,2 - 1,72                          | 1,72 - 2,26                | 2,26 - 6,1       |
|                               | Cicatrici (%)          | 17,96 | 10,06         | 0 - 10                      | 10 - 16,85                          | 16,85 - 24,5               | 24,5 - 49,5      |
|                               | <b>Pleure</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
|                               | Punteggio medio        | 0,95  | 0,51          | 0,05 - 0,48                 | 0,48 - 0,99                         | 0,99 - 1,3                 | 1,3 - 2,14       |
|                               | Indice APP             | 0,85  | 0,49          | 0 - 0,42                    | 0,42 - 0,85                         | 0,85 - 1,19                | 1,19 - 2,09      |
|                               | <b>Fegato</b>          |       |               |                             |                                     |                            |                  |
| Lesioni gravi (%)             | 10,37                  | 8,38  | 0 - 4         | 4 - 8,1                     | 8,1 - 14,6                          | 14,6 - 49,4                |                  |
| Punteggio medio               | 1,36                   | 0,20  | 1,07 - 1,2    | 1,2 - 1,32                  | 1,32 - 1,47                         | 1,47 - 2,11                |                  |

Tabella 1. Analisi descrittiva delle lesioni in sede di macellazione. I quartili della loro distribuzione sono stati usati per creare quattro gruppi di classificazione delle aziende in base al loro punteggio.

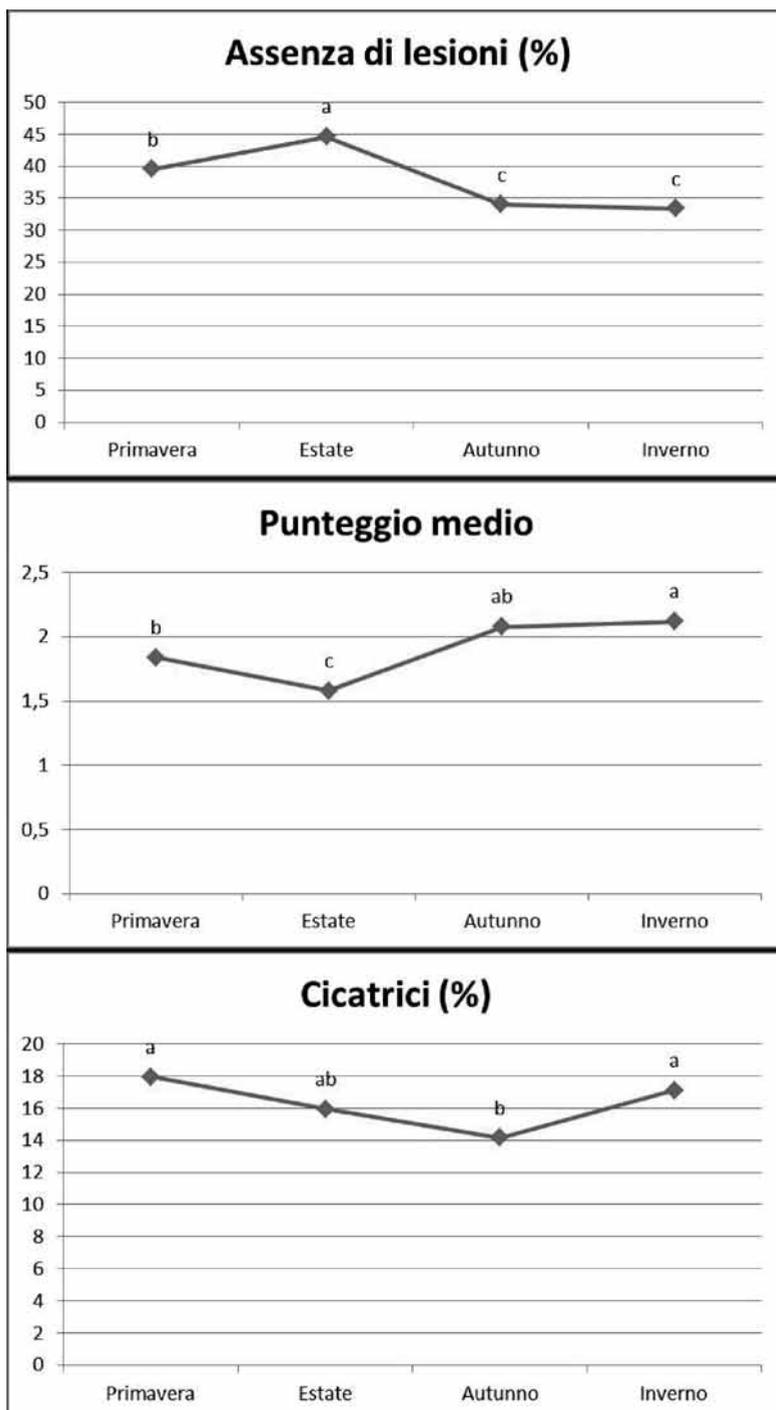


Figura 1. Valori stagionali dei parametri valutati nei polmoni. a,b lettere diverse indicano significatività statistica

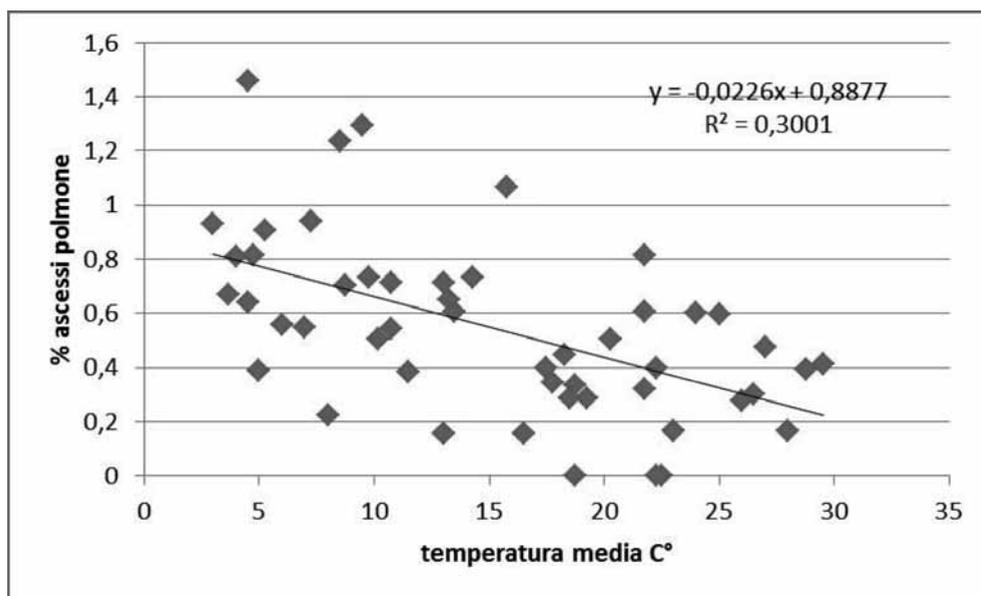


Figura 2. Correlazione tra T° media climatica della settimana precedente la macellazione e percentuale di ascessi polmonari riscontrati in sede di macellazione (P = 0,002).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE:

Per ciascuna lesione osservata in sede di macellazione sono stati calcolati i quartili della distribuzione delle aziende, evidenziando i range di valori di quattro gruppi di aziende: molto problematiche, moderatamente problematiche, poco problematiche, le migliori (Tabella 1). All'analisi statistica, la stagionalità ha mostrato forte effetto su tutte le lesioni valutate (Figura 1). Per quanto riguarda i polmoni, i suini macellati d'estate hanno mostrato la maggiore la percentuale di animali sani (P < 0,001) ed il punteggio medio inferiore (P < 0,001). La percentuale di cicatrici minore è stata invece riscontrata sia in estate che in autunno (P = 0,003). L'inverno invece la stagione di macellazione più colpita da lesioni polmonari. Nessuna differenza significativa invece per le pleuriti nelle diverse stagioni. Le lesioni epatiche gravi sono state osservate in percentuale più elevata durante la primavera e l'estate (P < 0,001), così come anche il punteggio medio (P < 0,001). Dall'analisi climatica, sono emerse delle correlazioni con la temperatura massima, la minima e la media la settimana precedente la macellazione: più faceva caldo e maggiore era la percentuale di polmoni sani (correlazione con T° massima = 0,59; T° minima = 0,59; T° media = 0,59; P < 0,001), mentre scendeva il punteggio medio (correlazione con T° massima = -0,54; T° minima = -0,53; T° media = -0,54; P < 0,001). Allo stesso modo diminuiva la percentuale di ascessi polmonari (correlazione con T° massima = -0,53; T° minima = -0,48; T° media = -0,50; P = 0,002; Figura 2) e la percentuale di lesioni pleuriche gravi (correlazione con T° massima = -0,38; T° minima = -0,43; T° media = -0,43; P = 0,006). I sequestri hanno mostrato invece una correlazione diretta solo con il tasso di umidità (correlazione = 0,41; P = 0,003). Nessuna correlazione climatica per le lesioni del fegato. Nell'analisi dei parametri climatici riscontrati 13 settimane prima della macellazione, è emersa una correlazione con le temperature climatiche e la percentuale di cicatrici polmonari: più faceva caldo e minori cicatrici erano presenti in sede di macellazione (correlazione con T° massima = -0,44; T° minima = -0,40; T° media = -0,44; P = 0,004). Il controllo delle lesioni al macello è uno strumento che in tutta Europa sta acquisendo sempre

maggior importanza perché fornisce un importante feedback dal macello all'allevamento con lo scopo di mettere a conoscenza a monte del ciclo di produzione ciò che spesso è visibile solo a valle (10). In uno studio inglese, è stato osservato che le aziende che prestavano attenzione al feedback ricevuto con il report al macello miglioravano nel tempo il loro punteggio, presumibilmente adottavano misure migliorative nella gestione delle patologie (10). Per poter capire però come ci si colloca all'interno della situazione di ciascun Paese e di ciascuna tipologia di produzione, è chiaramente indispensabile conoscere i ranges di riferimento per ciascuna lesione. Il presente lavoro ha evidenziato come tali ranges debbano essere stagionali e non su base annuale, in modo da permettere una maggiore precisione nella valutazione del proprio punteggio. I periodi più a rischio per le lesioni a carico dell'apparato respiratorio sono certamente quelli invernali, ed una partita macellata in questa stagione mostrerà inevitabilmente un quadro di lesioni fresche. È tuttavia importante sottolineare come l'osservazione dei visceri al macello può dare informazioni su quanto è accaduto a livello respiratorio fino a 13 settimane prima della data di macellazione, confermando quanto riportato da Maes et al. (7) e Caswell e Williams (1) sulle tempistiche di cicatrizzazione delle lesioni. Sembra infatti che la lesione polmonare Mycoplasma-like sia ben visibile sul viscere da due settimane dopo l'infezione per almeno due mesi. Se la lesione antecedente invece, sul viscere sarà visibile solo la cicatrice. Done (2) spiega come i suini che passano l'inverno nei capannoni convenzionali dell'allevamento intensivo siano quelli che maggiormente risentono di una scarsa qualità dell'aria dovuta alla riduzione della ventilazione per il mantenimento delle temperature interne. Chiaramente questa pratica è alla base dell'aumento dell'incidenza di patologie respiratorie. La correlazione emersa con i principali parametri climatici d'altra parte sottolinea come la gestione delle temperature interne dei capannoni e il conseguente microclima sia estremamente delicata e spesso sottovalutata. Al contrario delle patologie respiratorie, la stagione calda favorisce le lesioni epatiche. Il risultato è in accordo con precedenti studi (11, 5) ed è spiegabile con lo sviluppo delle uova di *A. suum* durante le alte temperature (14). L'esistenza di una forte differenza stagionale anche a livello di lesioni epatiche indica la mancanza o l'insufficienza dei piani di controllo del parassita in molte realtà aziendali.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Caswell, J.L., Williams, K.J., 2007. Respiratory system. In: M Grant Maxie (Ed.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. Elsevier Saunders, pp. 591-593.
2. Done, S.H., 1991. Environmental factors affecting the severity of pneumonia in pigs. *Vet Rec.* 128, 582-586.
3. Dottori, M., Nigrelli, A.D., Bonilauri, P., Merialdi, G., Gozio, S., Cominotti, F., 2007. Proposta per un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione. La griglia SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System). *Large Animal Review* 13, 161-165.
4. Elbers, A.R.W., Tielen, M.J.M., Snijders, J.M.A., Cromwijk, W.A.J., Hunneman, W.A., 1992. Epidemiological studies on lesions in finishing pigs in the Netherlands. I. Prevalence, seasonality and interrelationship. *Preventive Veterinary Medicine* 14, 217-231.
5. Goodall, E.A., McLoughlin, E.M., Menzies F.D., McIlroy S.G., 1991. Time series analysis of the prevalence of *Ascaris suum* infections in pigs using abattoir condemnation data. *Animal Production* 53, 367-372.
6. Madec, F., Derrien, H., 1981. Fréquence, intensité et localisation des lésions pulmonaires chez le porc charcutier: Résultats d'une première série d'observations en abattoir. *Journées de la Recherche Porcine en France* 13, 231-236.
7. Maes, et al. "Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs." *Veterinary microbiology* 126.4 (2008): 297-309.

8. Merialdi, G., et al. "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* 193.1 (2012): 234-239.
9. Sanchez-Vazquez, M. J., et al. "The British pig health schemes: integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring." *Veterinary Record-English Edition* 169.16 (2011): 413.
10. Sanchez-Vazquez; Mirjam Nielen; George J. Gunn; Fraser I. Lewis (2012). Using seasonal-trend decomposition based on loess (STL) to explore temporal patterns of pneumonic lesions in finishing pigs slaughtered in England, 2005-2011. *Prev Vet Med.* 2012 Apr 1; (1-2):65-73.
11. Sanchez-Vazquez; Mirjam Nielen; George J. Gunn; Fraser I. Lewis. National monitoring of *Ascaris suum* related liver pathologies in English abattoirs: a time-series analysis, 2005-2010. *Vet Parasitology* 2012 Feb 28; 184(1):83-7.
12. Sorensen, V., Jorsal, S.E., Mousin, J., 2006. Diseases of Respiratory System. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, pp. 149-177.
13. Stewart T.B. Hoyt P.G. 2006. Internal Parasites. In: Straw, EB; Zimmerman, JJ; D'Allaire, S; Taylor, DJ;. *Diseases of Swine*. Ninth Edition. Blackwell Publishing, pp. 904-905.
14. Wagner, B., Polley, L., 1999. *Ascaris suum*: seasonal egg development rates in a Saskatchewan pig barn. *Veterinary Parasitology* 85, 71-78.
15. Willeberg, P., Gerbola, M.-A., Petersen, B.K., Andersen, J.B., 1984. The Danish pig health scheme: Nation-wide computer-based abattoir surveillance and follow-up at the herd level. *Preventive Veterinary Medicine* 3, 79-91.



# INDAGINE SU BIOSICUREZZA E CONSUMO DI ANTIMICROBICI IN 25 ALLEVAMENTI SUINI DA INGRASSO: CONFRONTO TRA DIVERSI STANDARD DI MISURAZIONE

SCALI F.<sup>[1]</sup>, GIACOMINI E.<sup>[1]</sup>, LAZZARO M.<sup>[1]</sup>, VEZZOLI F.<sup>[1]</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>[1]</sup>,  
PATERLINI F.<sup>[1]</sup>, NIGRELLI A.<sup>[1]</sup>, BOLDINI M.<sup>[1]</sup>, PRATI P.<sup>[1]</sup>, PAOLO P.<sup>[2]</sup>,  
VITALI A.<sup>[3]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy,

<sup>[3]</sup>Unità Organizzativa Veterinaria - Regione Lombardia ~ Milano ~ Italy

Keywords: antimicrobials, biosecurity, DDD

## Riassunto

Gli antimicrobici trovano largo impiego nell'allevamento suinicolo ed i fenomeni di antibiotico resistenza destano sempre più preoccupazione. La riduzione dell'uso di antimicrobici è possibile soltanto attraverso un efficace sistema di monitoraggio, basato su standard affidabili, che consideri anche di altri parametri che potrebbero influenzare i consumi. Lo scopo di questo studio è identificare potenziali standard e valutare il rapporto tra consumi, dimensioni aziendali e biosicurezza. I consumi di 25 allevamenti da ingrasso sono stati analizzati utilizzando tre unità di misura: milligrammi di principio attivo consumati per produrre un chilogrammo di carne (mg PA / kg carne), Defined Daily Doses Animal for Italy (DDDAit) e Defined Course Doses Animal for Italy (DCDAit). Quattro indicatori derivati da DDDAit/DCDAit sono stati identificati: giorni/anno, cicli/anno, DDDAit e DCDAit consumate per suino prodotto. La biosicurezza è stata analizzata con un questionario. I consumi medi sono risultati: 20,19 giorni/anno, 3,73 cicli/anno, 134 mg Pa / kg carne, 2.112 DDDAit e 390 DCDAit per suino. Nessuna correlazione è stata individuata tra biosicurezza, consumi e dimensioni aziendali. Gli indicatori basati su DDDAit/DCDAit forniscono utili informazioni sul consumo di antibiotici, tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini con un campione più ampio ed un maggior approccio integrato che consideri nuovi parametri da analizzare ed ampli i dati raccolti su quelli già inclusi.

## Abstract

Antimicrobials (Ams) are widely used in pig farms and antimicrobial resistance in an increasingly serious menace. A monitoring system is pivotal to reduce Ams consumption. An efficient system must be based on reliable standards and it should consider other parameters that can increase Ams usages. The aim of this study was to identify potential standards of measurement. Correlations between Ams consumption, biosecurity and farm size were also evaluated. Three units of measurement were used to assess Ams consumption in 25 fattening pig farms: milligrams of active ingredient consumed to produce a kilogram of meat (mg AI / kg meat), Defined Daily Doses Animal for Italy (DDDAit) e Defined Course Doses Animal for Italy (DCDAit). Four indicators, based on DDDAit/DCDAit, were also identified: days/year, cycles/year, DDDAit and DCDAit used per pig produced. Biosecurity levels were evaluated via questionnaire. Mean Ams consumptions were: 20.19 days/year, 3.73 cycles/year, 134 mg AI / kg meat, 2,112 DDDAit and 390 DCDAit per pig. No correlations were founded between Ams consumption, biosecurity and farm size. Indicators based on DDDAit/DCDAit can provide useful data on Ams

usages. Further studies with a larger sample size are required to assess correlations between Ams usages and other parameters. In addition, an integrated approach should be used, with the inclusion of new parameters analyzed and more data collected on the ones already considered in this study.

### **INTRODUZIONE:**

Nell'allevamento suinicolo italiano viene fatto un ampio utilizzo di antibiotici e, nel corso degli anni, il fenomeno dell'antibiotico-resistenza ha subito un preoccupante incremento (3). I geni di resistenza possono essere trasmessi per via cromosomica o, in maniera molto più rapida e diffusiva, attraverso elementi genetici mobili (8). Le conseguenze di tali fenomeni non sono tuttavia limitate all'allevamento suino ma possono interessare anche la salute umana, come evidenziato anche dalla recente scoperta del gene di resistenza alle polimixine *mcr-1* identificato in campioni di origine sia suina che umana ed in grado di trasmettersi rapidamente, attraverso un plasmide, tra diverse enterobatteriacee (6). L'implementazione di azioni atte a ridurre l'uso di antibiotici è fondamentale per conservarne l'efficacia e per preservare la salute pubblica; tuttavia, tali azioni non possono essere intraprese senza un solido sistema di controllo (4). Durante l'ultimo decennio sono stati definiti diversi indicatori per il monitoraggio del consumo di antibiotici in ambito veterinario, tra questi, i principali (2, 5, 7, 9, 10, 12) sono derivati delle Defined Daily Dose (DDD) umane ideate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità; ciò nonostante, allo stato attuale uno standard internazionale univoco per la medicina veterinaria non è ancora stato identificato. In fine, le politiche atte alla riduzione dei consumi, per essere efficaci, dovrebbe prevedere un approccio integrato che tenga conto di ulteriori parametri quali la biosicurezza, le produzioni, il benessere e la sanità animale (1). Lo scopo di questo studio è identificare potenziali standard per il monitoraggio dei consumi di antibiotici e valutare, in maniera preliminare, il rapporto tra tali consumi e altri parametri dell'allevamento quali dimensioni aziendali (sulla base delle produzioni annuali) e livelli biosicurezza.

### **MATERIALI E METODI:**

**Campionamento e raccolta dati** Un campione di convenienza, costituito da 25 allevamenti, è stato selezionato per testare il sistema; tutte le aziende incluse nel campionamento dovevano rispettare tre criteri: indirizzo produttivo ingrasso, ubicazione in Regione Lombardia, produzione minima 900 suini per anno. Le aziende coinvolte nello studio sono state visitate, durante il 2015, da due operatori (un veterinario ASL ed uno IZSLER) che hanno provveduto a raccogliere retrospettivamente dati relativi al consumo di antibiotici per il 2014 e informazioni sulle produzioni, quali, il numero di animali allevati e macellati nel 2014 ed il loro peso alla vendita. Tali operatori, durante la visita aziendale, hanno inoltre somministrato all'allevatore un questionario sul tema della biosicurezza. La raccolta dati in campo è avvenuta tramite un'applicazione informatica compatibile con i principali sistemi operativi (Windows, iOS, Android) ed utilizzabile sia su tablet sia su computer portatile, secondo le preferenze dell'operatore. I dati così raccolti sono stati quindi immagazzinati in un apposito database XML. **Calcolo dei consumi di antibiotico** I consumi di antimicrobici a livello aziendale sono stati misurati attraverso tre indicatori: i milligrammi di principio attivo consumati per produrre un chilogrammo di carne (mg PA / kg carne), le Defined Daily Doses Animal for Italy (DDDAit) e le Defined Course Doses Animal for Italy (DCDAit). La DDDAit di un antibiotico è stata definita come la quantità (mg) giornaliera di principio attivo da somministrare per kg di peso vivo, secondo la prescrizione indicata dal prontuario ministeriale o dalle caratteristiche del prodotto (CP); qualora la posologia

fosse espressa in Unità Internazionali, si è proceduto alla conversione in mg seguendo gli standard dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA/88728/2012). La DCDAit è stata calcolata moltiplicando la DDDAit per la durata (giorni) del trattamento sempre secondo la prescrizione indicata dal prontuario ministeriale o dalle CP. Il database XML è stato impostato per il calcolo automatico dei consumi annuali di DDDAit e DCDAit, secondo la seguente formula:  $(PA \text{ consumato [mg per anno]}) / (DDDAit \text{ o } DCDAit)$ . I consumi annuali sono stati inoltre rapportati alle dimensioni aziendali calcolando sia la quantità di DDDAit e DCDAit consumate per suino prodotto sia il numero medio di giorni e cicli di trattamento cui ogni suino allevato è stato potenzialmente esposto. Tali calcoli sono stati effettuati con Microsoft Excel 2010, previa estrazione dei dati dal database XML; nel caso di DDDAit e DCDAit per suino prodotto secondo la seguente formula:  $(DDDAit \text{ o } DCDAit [\text{consumo annuale}]) / (N^\circ \text{ di suini prodotti})$ . Per quanto riguarda la stima dei giorni e dei cicli medi annuali è stato stabilito un peso mediano al trattamento pari a 100 kg ed i consumi sono stati calcolati secondo la seguente formula:  $(DDDAit \text{ o } DCDAit [\text{consumo annual}]) / (N^\circ \text{ di suini allevati} \times 100)$ .

### Biosicurezza

Il livello di biosicurezza aziendale è stato analizzato con l'ausilio di un questionario (disponibile su richiesta) costituito da 34 domande a risposta multipla, 29 di carattere generale e cinque specifiche per l'ingrasso. Il punteggio di un allevamento veniva espresso in percentuale sul massimo ottenibile ed era tanto più elevato quanto migliore era il livello di biosicurezza di tale azienda.

### Analisi Statistica

La distribuzione delle variabili relative alla produzione di carne, i livelli di biosicurezza e gli indicatori di consumo del farmaco è stata verificata col test omnibus di D'Agostino e Pearson (K2); la presenza di eventuali valori anomali (outliers) è stata indagata col metodo ROUT (robust regression and outlier removal). La correlazione tra produzione, biosicurezza e consumi di antimicrobici è stata analizzata secondo l'indice di correlazione per ranghi di Spearman o l'indice di correlazione lineare di Pearson. Tutte le analisi statistiche sono state svolte con GraphPad Prism 6.05.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

### Caratteristiche aziendali

I risultati produttivi delle aziende incluse nello studio sono riportati in tabella 1. La produzione complessiva è stata, per l'anno in analisi, pari a 25.684 tonnellate di carne (media 1.027, minimo 163, massimo 2.685) e 150.424 suini (media 6.017, minimo 961, massimo 15.798) con un peso medio di 170,74 kg (minimo 160, massimo 180,63). I suini allevati, compresi scarti e morti, sono risultati in totale 157.853 (media 6.314, minimo 1.057, massimo 16.588). Il punteggio medio, conseguito dagli allevamenti, relativamente al questionario biosicurezza è stato 64,1 (minimo 48,9, massimo 82,6).

### Consumo antibiotici

I consumi di antibiotico nelle aziende incluse nello studio sono riportati in tabella 1. I giorni medi di terapia annui sono stati pari a 20,19 (minimo 4,09, massimo 58,94); i cicli medi 3,73 (minimo 0,57, massimo 12,41) ed i mg di PA consumati per produrre un kg di carne si sono attestati in media a 134 (minimo 20, massimo 393). Gli allevamenti indagati hanno utilizzato in media 2.112 DDDAit (minimo 422, massimo 6.119) e 390 DCDAit (minimo 58, massimo 1.288).

|                    | <b>Totale</b> | <b>Media</b> | <b>Mediana</b> | <b>Minimo</b> | <b>Massimo</b> |
|--------------------|---------------|--------------|----------------|---------------|----------------|
| Carne prodotta (t) | 25.684        | 1.027        | 963            | 163           | 2.686          |
| Suini macellati    | 150.424       | 6.017        | 5.685          | 961           | 15.798         |
| Suini prodotti     | 157.853       | 6.314        | 5.995          | 1.057         | 16.588         |
| Biosicurezza       | NA            | 64,1         | 64,1           | 48,9          | 82,6           |
| PA consumato (kg)  | 3.885         | 155,4        | 95,5           | 5,6           | 759,8          |
| DDDAit (migliaia)  | 350.275       | 14.011       | 9.220          | 693           | 68.208         |
| DCDAit (migliaia)  | 64.704        | 2.588        | 1.864          | 96            | 14.362         |
| Mg PA / kg carne   | NA            | 134          | 108            | 20            | 393            |
| Giorni / anno      | NA            | 20,19        | 16,82          | 4,09          | 58,94          |
| Cicli / anno       | NA            | 3,73         | 3,03           | 0,57          | 12,41          |
| DDDAit / suino     | NA            | 2.112        | 1.812          | 422           | 6.119          |
| DCDAit / suino     | NA            | 390          | 322            | 58            | 1.288          |

Tabella 1: produzioni aziendali, livelli di biosicurezza e consumi farmaco

La distribuzione dei consumi, secondo la tipologia di somministrazione, e le differenze tra i vari indicatori sono riportate nella tabella 2. Nel caso delle DDDAit, le somministrazioni sono risultate così divise: 5,8% iniettabili, 11,2% polveri orali, 15,2% soluzioni orali, 67,8% premix. Le aziende in esame hanno utilizzato, nell'arco del 2014, complessivamente 28 PA diversi; di questi i cinque più consumati sono risultati amoxicillina, lincomicina, tiamulina, clortetraciclina e doxiciclina secondo tutti gli indicatori adottati. Tuttavia, si sono registrate delle differenze tra le modalità di misura dei consumi da un minimo dello 0,6% fino ad un massimo dell'86,5% (vedi tabella 2).

|                  | <b>Mg (%)</b> | <b>DDDAit (%)</b> | <b>DCDAit (%)</b> | <b>Variaz. (%) DDDAit/mg</b> | <b>Variaz. (%) DCDAit/mg</b> | <b>Variaz. (%) DDDAit/DCDAit</b> |
|------------------|---------------|-------------------|-------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------------------|
| Iniettabili      | 2,1           | 3,4               | 5,5               | 57,9                         | 156,7                        | -38,5                            |
| Polveri OS       | 11,2          | 10,8              | 11,2              | -3,4                         | 0,5                          | -3,8                             |
| Soluzioni OS     | 9,9           | 12,7              | 14,2              | 27,9                         | 42,7                         | -10,4                            |
| Premix           | 76,8          | 73,2              | 69,2              | -4,7                         | -9,9                         | 5,8                              |
| Amoxicillina     | 22,0          | 13,7              | 13,7              | -37,5                        | -37,5                        | 0,0                              |
| Lincomicina      | 15,0          | 15,1              | 8,1               | 0,6                          | -46,1                        | 86,5                             |
| Tiamulina        | 13,8          | 25,7              | 28,6              | 85,9                         | 106,9                        | -10,2                            |
| Clortetraciclina | 14,4          | 7,0               | 7,9               | -51,5                        | -44,7                        | -12,3                            |
| Doxiciclina      | 12,2          | 12,9              | 11,9              | 6,0                          | -2,7                         | 9,0                              |

Tabella 2: confronto tra distribuzioni e variazioni dei consumi secondo diversi standard di misurazione, stratificati per tipologia di somministrazione e cinque PA più utilizzati

#### Distribuzione dei risultati e correlazioni

La produzione di carne ed i punteggi relativi alla biosicurezza sono risultati normalmente distribuiti (p-value rispettivamente 0,3579 e 0,7328) mentre i consumi di farmaco hanno mostrato una certa asimmetria. Tuttavia, senza il riscontro di outliers.

La produzione di carne non è risultata correlata né con i livelli di biosicurezza né con i

consumi di antibiotico; inoltre, non si è rilevata alcuna correlazione tra biosicurezza e consumi per le aziende indagate.

#### Importanza e limiti degli standard DDDA/DCDA

Il limite principale degli indicatori di consumo tarati sul volume o sulla massa consumata, come nel caso dei mg PA / kg carne, è noto ormai da alcuni anni (5) ed è alla base di delle discrepanze tra mg utilizzati e DDDAit (o DCDAit) illustrate nella tabella 2. Gli standard di misura volumetrici, infatti, non tengono conto della potenza dei diversi PA, problematica particolarmente evidente per i farmaci iniettabili di più recente introduzione come marbofloxacina, tulatromicina o tildipirosina. Pertanto, a fronte di una riduzione dei mg consumati può, paradossalmente, verificarsi un aumento del numero di somministrazioni per capo. Un altro limite considerevole dei mg PA / kg carne è legato all'indirizzo produttivo dell'azienda, nelle aziende da riproduzione, ad esempio, dove la produzione di carne è relativamente limitata, i trattamenti sui riproduttori potrebbero far innalzare notevolmente l'indicatore mg PA / kg carne pur mantenendo, a livello di dosi somministrate, consumi inferiori ad un ingrasso.

La messa a punto di un sistema di monitoraggio che impieghi standard di misurazione basati sulle dosi giornaliere non presenta le problematiche legate agli indicatori volumetrici; inoltre, l'implementazione di misurazioni che tengano conto anche dei cicli terapeutici può fornire utili indicazioni sulla durata trattamenti utilizzati (vedi differenze DDDAit e DCDAit in tabella 2). Tuttavia, anche i sistemi basati sugli standard DDD/DCD presentano dei limiti rilevanti poiché sono impostati sulle posologie definite per legge e non tengono conto dei dosaggi realmente somministrati agli animali allevati. Studi effettuati in Germania e Belgio sulla relazione tra dosi reali e dosi definite hanno evidenziato una tendenza a sovradosare gli antibiotici iniettabili e sottodosare quelli somministrati per OS (7, 11); alcuni Autori hanno quindi proposto di adottare un ulteriore indicatore che prenda in considerazione il rapporto tra dosi reali e dosi definite (11), tuttavia, l'implementazione di tale indicatore in un sistema di monitoraggio dei consumi su larga scala (regionale o nazionale) non risulta tecnicamente possibile.

#### Prospettive future verso uno standard comunitario ed un approccio integrato

L'adozione di un sistema di monitoraggio del consumo di antibiotici basato sulle DDD/DCD rappresenterebbe un utile compromesso per ovviare da un lato alla scarsa precisione degli indicatori basati sulla massa e dall'altro ai limiti tecnici delle misurazioni sui consumi reali per singolo animale. Inoltre, tale sistema preparerebbe il nostro Paese all'adozione dei futuri standard Comunitari, DDDvet e DCDvet, i cui principi fondanti sono già stati stabiliti dall'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA/710019/2014). Lo studio attuale non ha evidenziato correlazioni statisticamente significative tra produzioni di carne (parametro scelto come indicatore delle dimensioni aziendali), biosicurezza e consumi; tuttavia, un campionamento limitato a soli 25 allevamenti non può essere considerato rappresentativo della realtà suinicola italiana. I rapporti tra utilizzo di antibiotici e gli altri parametri necessitano pertanto di ulteriori indagini su un campione più numeroso. Nelle future ricerche sarebbe inoltre opportuno puntare ad un maggiore approccio integrato inserendo nuovi parametri da analizzare (benessere animale, stato sanitario dell'allevamento, campionamento al macello) ed ampliando le informazioni raccolte su quelli attuali (biosicurezza, dati produttivi) così da fornire un quadro più chiaro sia della situazione aziendale sia delle eventuali misure da intraprendere per ridurre i consumi di antimicrobici.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Aarestrup F.M., 2015. The livestock reservoir for antimicrobial resistance: a personal view on changing patterns of risks, effects of interventions and the way forward. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*. Vol. 370 (issue 1670).
2. Bos M.E.H., Taverne F.J., van Geijlswijk I.M., Mouton J.W., Mevius D.J. and Heederik D.J.J., 2013. Consumption of Antimicrobials in Pigs, Veal Calves, and Broilers in The Netherlands: Quantitative Results of Nationwide Collection of Data in 2011. *Plos One*. Vol. 8 (issue 10).
3. Garcia-Migura L., Hendriksen R.S., Fraile L. and Aarestrup F.M., 2014. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. Vol. 170 (issue 1-2); pag. 1-9.
4. Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H., Jarlier V., Kluytmans J., Laxminarayan R., Saam M., Van Belkum A. and Pittet D., 2015. Antimicrobial resistance: one world, one fight! *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. Vol. 4 (issue 1).
5. Jensen V.F., Jacobsen E. and Bager F., 2004. Veterinary antimicrobial-usage statistics based on standardized measures of dosage. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 64 (issue 2); pag. 201-215.
6. Liu Y.Y., Wang Y., Walsh T.R., Yi L.X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.H. and Shen J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. Vol. 16 (issue 2); pag. 161-168.
7. Merle R., Robanus M., Hegger-Gravenhorst C., Mollenhauer Y., Hajek P., Kasbohrer A., Honscha W. and Kreienbrock L., 2014. Feasibility study of veterinary antibiotic consumption in Germany - comparison of ADDs and UDDs by animal production type, antimicrobial class and indication. *Bmc Veterinary Research*. Vol. 10 (issue 7).
8. Michael G.B., Freitag C., Wendlandt S., Eidam C., Fessler A.T., Lopes G.V., Kadlec K. and Schwarz S., 2015. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiol*. Vol. 10 (issue 3); pag. 427-443.
9. Postma M., Sjolund M., Collineau L., Losken S., Stark K.D.C. and Dewulf J., 2015. Assigning defined daily doses animal: a European multi-country experience for antimicrobial products authorized for usage in pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Vol. 70 (issue 1); pag. 294-302.
10. Taverne F.J., Jacobs J.H., Heederik D.J.J., Mouton J.W., Wagenaar J.A., van Geijlswijk I.M. and SDA N.V.M.A., 2015. Influence of applying different units of measurement on reporting antimicrobial consumption data for pig farms. *Bmc Veterinary Research*. Vol. 11; pag. 250-259.
11. Timmerman T., Dewulf J., Catry B., Feyen B., Opsomer G., de Kruif A. and Maes D., 2006. Quantification and evaluation of antimicrobial drug use in group treatments for fattening pigs in Belgium. *Preventive Veterinary Medicine*. Vol. 74 (issue 4); pag. 251-263.
12. Trauffer M., Griesbacher A., Fuchs K. and Kofler J., 2014. Antimicrobial drug use in Austrian pig farms: plausibility check of electronic on-farm records and estimation of consumption. *Veterinary Record*. Vol. 175 (issue 16); pag. 402-410.

# EFFETTO DEI MONOGLICERIDI NEL PERIPARTO DELLA SCROFA: PERFORMANCE DAL PARTO ALLO SVEZZAMENTO

RAFFI V.<sup>[1]</sup>, SCOLLO A.<sup>[1]</sup>, MAZZONI C.<sup>[1]</sup>, MIGLIORI M.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*Innovabiotics ~ Italy*

Keywords: Monoglyceride, Lactation, Farrowing

## Riassunto

I monogliceridi somministrati tramite l'alimento sono assorbiti dal tratto gastrointestinale e trasferiti al sangue; aggiunti alla dieta della scrofa hanno dimostrato di migliorare la salute ed i parametri produttivi del suino. Scopo del presente lavoro è stato investigare gli effetti dei monogliceridi somministrati per via orale alla scrofa a partire da 5 giorni prima dell'ingresso in sala parto fino allo svezzamento, valutando i parametri produttivi sia della scrofa che della nidata. I risultati hanno mostrato un risparmio alimentare nella scrofa durante la lattazione ed il miglioramento della risposta alla sincronizzazione del parto indotta con prostaglandine. I benefici sono stati più evidenti soprattutto nelle scrofe nullipare e primipare, e negli animali magri, che hanno mostrato una riduzione della natimortalità e della mortalità dei suinetti durante i primi 5 giorni di vita.

## Abstract

Monoglycerides from feed are absorbed in the gastrointestinal tract and transferred to the blood; added to the diet of the sow have been shown to improve piglet health and production parameters. Aim of the present work was to investigate the effect of monoglycerides orally administered to the sow from 5 days before farrowing until weaning, evaluating sow and litter parameters. Results showed the reduction of sow's ingestion during lactation and the improvement of farrowing synchronization with prostaglandins. Benefits were higher in particular in nulliparous and primiparous sows, and in thin animals, that showed a reduction in stillbirth and piglets' mortality during the first 5 days of life.

## INTRODUZIONE:

Diversi studi hanno evidenziato le proprietà positive ed il ruolo degli acidi grassi (come ad esempio l'acido butirrico) nella funzionalità dell'intestino animale. È stato dimostrato che l'acido butirrico apporta particolari benefici nella formazione della microflora intestinale della stimolazione della crescita degli e nell'integrità del tratto intestinale, aumentando così le resistenze contro i patogeni (3). Tuttavia, l'acidità intestinale, che varia tra pH 6 e 7, causa la dissociazione dell'acido butirrico e la conseguente significativa diminuzione della sua efficacia antibatterica nel tratto digerente distale. Differentemente, i monogliceridi (acidi grassi esterificati) hanno una maggiore azione antibatterica rispetto agli acidi grassi in sé, e lavorano sia a pH 3 che a pH 7. L'utilizzo dei monogliceridi dei suini in fase di ingrasso ha mostrato ad esempio una riduzione del rischio di contrarre *B.hydysenteriae*, aumentando l'ingestione alimentare e migliorando le performance (4). Nei suinetti invece, i monogliceridi sembrano migliorare la digeribilità della sostanza secca, del nitrogeno, dell'energia digeribile e dei grassi nell'intero tratto intestinale, in particolare l'ileo (2). Anche nella scrofa in gestazione e lattazione i benefici dei monogliceridi potrebbero essere importanti migliorando la capacità di assorbimento ed il controllo della microflora intestinale nelle fasi più critiche come ad esempio i primi parti. Uno degli effetti della miglior gestione a livello intestinale è sicuramente rappresentato dai suinetti durante il periodo della lattazione. Inoltre, i monogliceridi

potrebbero equilibrare il delicato cambio di equilibrio metabolico, chiamato “dis-omeoresi” da Martineau et al. (5), che i tessuti mettono in atto per supportare uno stato fisiologico così particolare come il parto. La “dis-omeoresi” sembrerebbe infatti alla base della sindrome disgalattica post-partum, la quale origine coinvolge anche l'efficienza del tratto intestinale della scrofa. Scopo del presente lavoro è stato determinare l'effetto dei monogliceridi somministrati alla scrofa nel peri-parto, valutando le performance della madre di suinetti dal parto fino allo svezzamento.

#### **MATERIALI E METODI:**

Lo studio è stato condotto in una scrofaia intensiva convenzionale e ha coinvolto un numero totale di 196 scrofe, sono state casualmente divise in 2 gruppi: il gruppo controllo (n = 101 scrofe) ed il gruppo trattato con monogliceridi (n = 95). Ad esclusione della somministrazione dei monogliceridi al gruppo trattato, tutti gli animali erano sottoposti a condizioni identiche manageriali, alimentari ed ambientali. Per annullare qualsiasi possibile influenza esterna, all'interno di ciascuna sala parto erano presenti in ugual numero scrofe appartenenti ad entrambi i gruppi. Il supplemento alimentare è stato somministrato quotidianamente alle scrofe del gruppo trattato a partire dal giorno di ingresso in sala parto (cinque giorni prima della data prevista del parto) fino allo svezzamento. Il dosaggio del supplemento alimentare dei primi 5 giorni è stato 15 ml/scrofa (Enteronova®), mentre dal parto allo svezzamento è stato 0,3% dell'alimento. Tutti i parti sono stati indotti con prostaglandine ed un sommario palleggiamento delle nidiate entro gruppo di trattamento è stato effettuato per uniformarne peso il numero. I parametri valutati sono stati per ciascuna scrofa la durata del parto, l'orario del parto e la risposta al protocollo induttivo, il numero di nati vivi, il numero di nati morti, la mortalità dei suinetti durante i primi 3 giorni di vita e durante l'intero periodo di lattazione. Inoltre è stato registrato il consumo alimentare delle scrofe durante l'intera lattazione, la loro temperatura rettale e lo stato delle feci al parto. Il punteggio fecale è stato assegnato usando una scala da 0 a 5, dove 0 era assenza di feci, 1 erano feci secche e pellettate, 2 feci tra il secco ed il normale, 3 uffici normali e soffici ma ben formate, 4 feci tra il normale e l'acquoso ma ancora consistenti, 5 feci molto acquose ed informi (6). Le analisi dei risultati sono state effettuate utilizzando il t-test di Student per il confronto tra medie ed il test del chi-quadro per il confronto di frequenze. Per una maggiore precisione dell'indagine, l'analisi è stata condotta suddividendo in sottoclassi i due gruppi principali di osservazione: sottoclasse per ordine di parto (giovani = 1-2 parto; medie = 3-5 parto; mature = dal 6 parto in poi) e sottoclasse per condizione corporea (magre  $\leq 20$  mm di spessore del lardo dorsale in P2; medie = 21-24 mm; grasse  $\geq 25$  mm).

#### **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Considerando i due gruppi di trattamento, la somministrazione dei monogliceridi ha diminuito il consumo totale di alimento per scrofa durante la lattazione (121,75 vs 125,93 kg;  $P < 0,05$ ). In figura 1 sono illustrati i consumi alimentari per ciascuna sottoclasse di scrofe. Questo risultato suggerisce un legame con quanto precedentemente riportato da Banno et al. (2002) nei ratti. Gli autori infatti hanno riportato un migliore assorbimento dei monogliceridi rispetto ai più comuni digliceridi e trigliceridi. D'altra parte già due decenni fa era stato osservato come i lipidi all'interno del piccolo intestino fossero in grado di modulare una cascata di eventi che portano alla regolazione dell'appetito e della sazietà (7, 8). Welch et al. (7, 8) osservarono infatti che nell'uomo questo portava una sazietà precoce e riduceva la necessità di ingerire energia. L'ipotesi formulata per i risultati del presente lavoro è che un maggiore assorbimento di nutrienti a livello intestinale nelle scrofe abbia esaurito precocemente la sensazione di fame limitando l'ingestione alle energie realmente necessarie. Il

gruppo trattato con monogliceridi ha inoltre sensibilmente migliorato la sincronizzazione dei parti e la risposta alla prostaglandina, diminuendo la percentuale di parti notturni e quindi non assistibili dall'operatore della sala parto (28,00 vs 36,58%;  $P < 0,05$ ). Secondo dati in via di pubblicazione (Migliori, comunicazione personale) l'utilizzo di monogliceridi sembra migliorare l'assorbimento non solo degli alimenti ma anche delle molecole somministrate per via parenterale. Sebbene il meccanismo non sia stato ancora del tutto chiarito, l'ipotesi sembra essere accreditata. Osservando i risultati all'interno delle sottoclassi, emergono differenze anche negli altri parametri osservati. Ad esempio nelle scrofe giovani, che notoriamente sono gli animali dalla gestione più delicata, i monogliceridi diminuiscono sia la percentuale di suinetti nati morti (3,74 vs 5,13%;  $P < 0,05$ ) che la percentuale di suinetti morti nei primi 3 giorni di vita (10,29 vs 14,47%;  $P < 0,05$ ) e nell'intera lattazione (16,37 vs 18,85%;  $P < 0,05$ ). D'altra parte la nullipara e la primipara sono scrofe che devono ancora terminare il proprio accrescimento e che, soprattutto nelle genetiche prolifiche, presentano i maggiori deficit energetici perché devono soddisfare non solo le proprie necessità ma anche quelle relative alla gravidanza ed alla successiva lattazione. Per quanto riguarda la condizione corporea, la sottoclasse che maggiormente ha beneficiato dei monogliceridi è quella delle magre, per le quali è diminuita la mortalità dei suinetti nei primi 3 giorni di vita (10,46 vs 12,12%;  $P < 0,05$ ) e durante l'intera lattazione (12,12 vs 14,17;  $P < 0,05$ ) in modo simile alle scrofe giovani. Inoltre le scrofe grasse hanno mostrato una riduzione della natimortalità (6,25 vs 7,84%;  $P < 0,05$ ). Osservando trasversalmente le diverse sottoclassi, emerge la capacità dei monogliceridi di rendere omogeneo il punteggio fecale stabilizzandolo sul 2 (feci tra il secco ed il normale), a differenza del gruppo controllo nel quale le scrofe tra il terzo e quinto parto e le scrofe magre hanno abbassato il proprio punteggio verso l'1 (feci secche e pellettate). Concludendo, la somministrazione di monogliceridi alle scrofe nel periparto ha ridotto il consumo alimentare, ottimizzandone l'assorbimento a livello intestinale, e ha migliorato la risposta al protocollo induttivo del parto. I benefici migliori si sono visti però nelle sottoclassi delle scrofe giovani e delle scrofe magre, per le quali sembra particolarmente raccomandata l'integrazione alimentare con i monogliceridi.

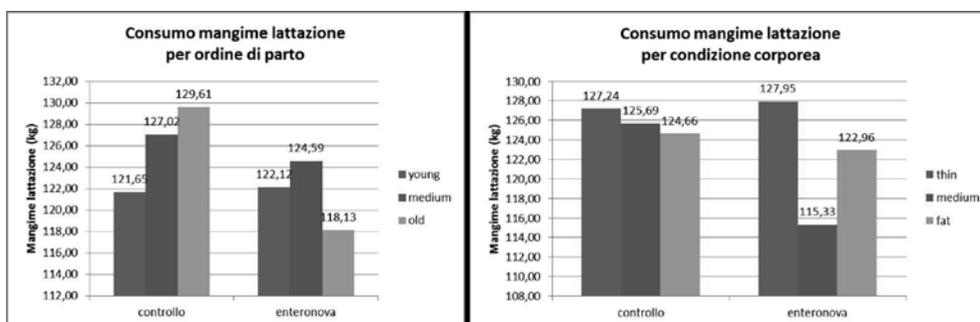


Figura 1. Consumo di mangime lattazione per ciascuna sottoclasse di scrofe.

## BIBLIOGRAFIA:

- Banno, F., Doisaki, S., Shimizu, N., & Fujimoto, K. (2002). Lymphatic absorption of docosahexaenoic acid given as monoglyceride, diglyceride, triglyceride, and ethyl ester in rats. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 48(1), 30-35.
- Cho, J. H., Chen, Y. J., Yoo, J. S., Kim, W. T., Chung, I. B., & Kim, I. H. (2008). Evaluation of fat sources (lecithin, mono-glyceride and mono-diglyceride) in weaned pigs: Apparent total tract and ileal nutrient digestibilities. *Nutrition research and practice*, 2(2), 130-133.

3. Claus, D. Günthner, H. Letzguß. 2007. Effects of feeding fat-coated butyrate on mucosal morphology and function in the small intestine of the pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 91: 312–318.
4. Foresti, A Pussi, E Giacomini, M Lazzaro, M Migliori, J Ruggeri, MG Zanoni, E Parini, G Coceva, P Pasquali, GL Alborali. Effect of specific mix of monoglycerides and diglycerides of short and medium chain fatty acids in fattening pigs diets to control swine dysentery. *Atti del congresso IPVS 2014*.
5. 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).
6. Oliviero, C., Kokkonen, T., Heinonen, M., Sankari, S., & Peltoniemi, O. (2009). Feeding sows with high fibre diet around farrowing and early lactation: impact on intestinal activity, energy balance related parameters and litter performance. *Research in veterinary science*, 86(2), 314-319.
7. Welch I, Saunders K, Read NW. Effect of ileal and intravenous infusions of fat emulsions on feeding and satiety in human volunteers. *Gastroenterology* 1985;89(6):1293 – 7.
8. Welch IM, Sepple CP, Read NW. Comparisons of the effects on satiety and eating behaviour of infusion of lipid into the different regions of the small intestine. *Gut* 1988;29(3):306 – 11.

# DINAMICA DELL'INFEZIONE DA BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DA INGRASSO ENDEMICAMENTE INFETTO

MASSACCI F.R.<sup>[1]</sup>, CUCCO L.<sup>[1]</sup>, DE LUCA S.<sup>[1]</sup>, FELICI C.<sup>[2]</sup>, SEBASTIANI C.<sup>[1]</sup>,  
TENTELLINI M.<sup>[1]</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM) ~ Perugia ~ Italy,*

<sup>[2]</sup>*Libero Professionista ~ Norcia ~ Italy*

Keywords: *Brachyspira hyodysenteriae*, shedding, clustering

## Riassunto

Il batterio anaerobio *Brachyspira hyodysenteriae* è l'agente eziologico della dissenteria suina (SD); malattia descritta da quasi un secolo ma per la quale mancano ancora dati relativi alla trasmissione in allevamento, fondamentali per impostare sistemi di controllo.

Scopo di questo lavoro è stato quello di verificare le modalità di escrezione in un allevamento da ingrasso endemicamente infetto, in presenza ed in assenza di diarrea, ed effettuare un confronto tra le due metodiche, batteriologico e PCR real-time.

*B. hyodysenteriae* è stata isolata dagli animali a partire dai 4 mesi circa di vita, mostrando un profilo multiresistente. La correlazione effettuata tra esame colturale e PCR real-time è risultata buona.

L'infezione non si è limitata ad un periodo circoscritto, ma ha interessato tutta la durata del ciclo, a dispetto dei trattamenti antimicrobici. Lo stesso animale poteva eliminare *B. hyodysenteriae* in modo continuativo fino ad un massimo di sei settimane; inoltre, alcuni soggetti hanno eliminato il batterio in momenti diversi, anche a distanza di 10 settimane, con o senza diarrea. Infine, l'infezione si è diffusa lentamente in allevamento, interessando i singoli box in momenti diversi, dimostrandone la marcata clusterizzazione.

I dati confermano la necessità di individuare misure di controllo della SD non basate sul trattamento antimicrobico, in un contesto di crescente pressione per la riduzione dell'impiego di antibiotici in suinicoltura.

## Abstract

*Brachyspira hyodysenteriae* is the etiological agent of swine dysentery (SD), an enteric disease which has been known about for almost a century, but there are few studies on the epidemiology of *B. hyodysenteriae* infection in swine herds, fundamental for setting up control systems. The focus of this study was to investigate the spread of *B. hyodysenteriae* in an endemically infected finishing herd with and without diarrhoea and to compare the two techniques, bacteriological and real-time PCR.

*B. hyodysenteriae* was isolated from animals four months old, with a multi-drug resistant profile. The correlation between the results from bacterial culture and real-time PCR in the finishing samples was rather good. The infection was not limited to a specific period, but affected the entire finishing cycle, in spite of antimicrobial treatments. The same animal was able to eliminate *B. hyodysenteriae* continuously up to a maximum of six weeks; in addition, some pigs eliminated the bacteria at different times, even after 10 weeks, with or without diarrhoea. Finally, the infection spread slowly in the herd, in the different boxes at different times, showing marked clustering.

The data confirm the necessity to find systems of SD control not based on antimicrobial treatment, in a context of increasing pressure to reduce the use of antibiotics in pig farming.

## **INTRODUZIONE:**

La dissenteria suina (Swine Dysentery, SD), di cui è responsabile il batterio *Brachyspira hyodysenteriae*, è una malattia enterica infettiva trasmissibile che si manifesta prevalentemente nelle fasi di magronaggio ed ingrasso. Clinicamente, la patologia si manifesta attraverso una diarrea muco-emorragica, con prevalenza e gravità variabile: la morbilità può raggiungere il 75%, mentre la mortalità si attesta generalmente tra il 5 e il 25% (1). L'infezione è generalmente introdotta negli allevamenti attraverso soggetti asintomatici e all'interno delle aziende tende a permanere in modo endemico, con frequenti recidive. Il contagio tra individui avviene in maniera diretta mediante le feci infette; la malattia si manifesta di norma dopo 10-14 giorni dal contatto (2). Nella fase acuta il soggetto può eliminare fino a 108-109 cellule batteriche per ogni grammo di feci; il patogeno può essere individuato nel materiale fecale per un periodo anche di 70 giorni dopo la scomparsa dei sintomi (2). Si assiste, perciò, ad un'evidente alterazione dei parametri produttivi, con riduzione del tasso di crescita e della efficienza della conversione alimentare, ai quali si devono aggiungere gli eventuali costi terapeutici. La dissenteria suina è quindi considerata una malattia dall'impatto economico rilevante (3).

L'individuazione della infezione nei suini è particolarmente problematica. La sintomatologia si può facilmente confondere con quella derivante da altre patologie; inoltre, in alcuni individui essa non risulta apprezzabile per effetto di altri fattori, quali la parziale efficacia di trattamenti precedenti e l'assunzione di diete in grado di contrastare i sintomi (4).

Nonostante la SD sia una malattia descritta da quasi un secolo, gli studi relativi all'epidemiologia della infezione da *B. hyodysenteriae* negli allevamenti suini sono scarsi (5). Pertanto risulta utile approfondire le conoscenze sulla diffusione e la trasmissione del patogeno negli allevamenti.

Scopo del presente lavoro, dunque, è stato quello di verificare le modalità di escrezione di *B. hyodysenteriae* in condizioni di campo in suini da ingrasso in presenza ed in assenza di diarrea, appartenenti ad un allevamento endemicamente infetto. Gli animali sono stati esaminati tramite metodiche tradizionali (valutazione della sostanza secca fecale ed esame colturale) e in PCR real-time, allo scopo di quantificare l'escrezione del patogeno nel corso di un naturale focolaio di dissenteria suina.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Campionamento**

È stato effettuato uno studio di coorte in una azienda di suini da ingrasso dell'Italia centrale, con un'anamnesi positiva per SD negli anni precedenti. Nell'allevamento, sono stati registrati i dati relativi alla somministrazione di antimicrobici agli animali. La settimana precedente l'inizio della sperimentazione, sono stati effettuati tamponi ambientali ed esaminati i roditori catturati in azienda. Gli animali, 50 soggetti distribuiti in due capannoni, sono stati identificati singolarmente, e sottoposti a prelievo all'ingresso in azienda. Con cadenza settimanale, è stata effettuata una osservazione clinica dei suini, per registrare l'eventuale presenza di diarrea. Successivamente, è stato effettuato un campionamento di feci o tampone rettale, su base individuale. Tutti i campioni, mantenuti a temperatura di refrigerazione e conferiti al laboratorio entro 4 ore, sono stati sottoposti a test batteriologico selettivo per la ricerca di *Brachyspira* spp. e alla valutazione della sostanza secca fecale. Nel caso l'animale presentasse diarrea, i campioni sono stati sottoposti ad esame batteriologico per escludere la presenza di ETEC e *Salmonella* spp. e a PCR nested per escludere la presenza di *Lawsonia intracellularis*. Un'aliquota è stata conservata a -20°C per l'esecuzione della PCR real-time.

#### Stima della sostanza secca fecale

È stata effettuata mediante tecnica di essiccamento a microonde, come descritto da Pedersen (6).

Il calcolo della sostanza secca fecale è stato effettuato secondo la seguente formula:

$SS\% = (\text{peso finale} - \text{tara}) / \text{peso feci iniziale} \times 100$ .

I dati relativi alla sostanza secca fecale sono stati suddivisi in quattro categorie, sulla base dei valori di cut-off indicati da Pedersen (6).

#### Esame colturale selettivo per *Brachyspira* spp.

L'esame colturale è stato effettuato come altrove descritto (7). In breve, è stata effettuata una semina del materiale fecale in TSA-BJ medium, seguita da incubazione a  $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 5 giorni. Le colture sono state identificate come sospette basandosi sulla presenza di emolisi e sull'esito dell'esame microscopico.

Le colonie provenienti dalle piastre positive sono state, quindi, sottoposte ad estrazione del DNA mediante bollitura, seguita da PCR end-point secondo il protocollo descritto da La (8).

#### Esame colturale per la ricerca di ETEC e *Salmonella* spp.

È stato effettuato un esame batteriologico dalle feci utilizzando due terreni Agar sangue (AS) e McConkey Agar (MC), seguito da un'incubazione di  $37^{\circ}\text{C}$  per 24-48 ore. Al termine di questo periodo è stata valutata crescita e la morfologia delle colonie batteriche. Successivamente, le colonie sospette per *E. coli* e *Salmonella* spp. su base morfologica e con riferimento alla produzione di lattosio sono state isolate, annotando l'eventuale presenza di emolisi. Le colonie sono state quindi sottoposte a conferma biochimica (API Rapid 20E, Bio-Merieux). Infine, è stata effettuata una ricerca dei geni codificanti per i principali fattori di virulenza per i ceppi di *E. coli* tramite PCR (9).

#### PCR per *Lawsonia intracellularis*

Sono stati sottoposti a PCR nested per la ricerca di *L. intracellularis* i campioni di feci diarroiche seguendo la metodica descritta da Jones (10).

#### Test della Minima Concentrazione Inibente

Isolati positivi per *B. hyodysenteriae* e *B. pilosicoli* sono stati sottoposti al test della Minima Concentrazione Inibente (MIC) sulla base di quanto già descritto da Rohde (11). I breakpoint clinici per l'interpretazione dei dati di MIC per *B. hyodysenteriae* sono stati proposti da Ronne e Szancer (12).

#### PCR real-time

Sono stati esaminati 244 campioni fecali selezionandoli da diversi animali e da diversi stadi di infezione. I DNA estratti dalle feci sono stati analizzati tramite PCR real-time multiplex come descritto da Willems nel 2010 (13). I primer e le sonde utilizzate sono dirette all'amplificazione del gene *nox* per *Brachyspira* spp. e del gene *aspA* per *L. intracellularis*. La reazione e l'analisi quantitativa sono state condotte sulla base di quanto già descritto (14). Le reazioni sono state eseguite utilizzando la piattaforma FAST 7500 HT Sequence Detection System (Life Technologies).

#### Analisi statistica

È stata valutata la concordanza tra PCR real-time ed esame colturale per *B. hyodysenteriae* utilizzando il test K di Cohen.

## RISULTATI E DISCUSSIONE:

I tamponi ambientali effettuati prima dell'ingresso dei suini in allevamento sono risultati negativi. Nel corso del lavoro, sono stati effettuati 50 campioni in 21 giornate diverse. Trentadue suini nella coorte hanno eliminato *B. hyodysenteriae* almeno una volta nel corso dell'indagine. Tuttavia questo numero potrebbe essere sottodimensionato, perché 21 animali non sono stati seguiti fino al termine dell'indagine, principalmente per la perdita dell'ear tag a partire dal quindicesimo prelievo.

Per quanto riguarda la presenza di altri patogeni nelle feci diarroiche, durante il lavoro nessun campione è risultato positivo per *Salmonella* spp. Al contrario, nelle prime fasi del campionamento (suini fino ai 3 mesi di età), 10 campioni sono risultati positivi per *E. coli* emolitico, di cui uno solo positivo anche a *B. hyodysenteriae*. Gli animali campionati erano stati sottoposti a diversi trattamenti antimicrobici durante la loro carriera produttiva. A 3 mesi gli è stata somministrata tiamulina per 10 gg (160 ppm), a 4 mesi di età tilosina per 5gg (200 ppm), a 5 mesi aivlosina per 7 gg (63,75 ppm) e nuovamente tiamulina a 6 mesi per 10 gg (160 ppm) e a 7 per 20 gg (80 ppm). I dati relativi alla categorizzazione delle feci e all'esito dell'esame colturale sono indicati in tabella 1, mentre in griglia 1 sono mostrati i risultati dei campionamenti effettuati nel corso dell'indagine, suddivisi individualmente e per box.

La correlazione effettuata tra esame batteriologico e PCR real-time a partire dai campioni provenienti dall'ingrasso, è risultata buona, collocandosi a un valore di 0,758 (I.C. 95% 0.627-0.889), che è considerato nella scala di Altman un accordo buono. La PCR real-time ha permesso di evidenziare costantemente un numero di suini escretori più elevato, anche se non può essere ancora identificata come uno strumento per escludere la presenza di portatori, anche a motivo del suo costo elevato.

Dall'esame generale dei risultati emerge innanzitutto la lunga durata dell'escrezione batterica: il primo animale escretore è stato infatti rilevato a distanza di due mesi circa dall'introduzione in azienda, e l'escrezione è proseguita ininterrottamente nella coorte fino al termine del ciclo produttivo. Non solo, anche la presenza di diarrea associata ad infezione si è mantenuta per tutta la durata del lavoro. Non abbiamo potuto infatti osservare una maggiore suscettibilità alla infezione alla malattia in suini di una età definita. Lo stesso animale poteva eliminare *B. hyodysenteriae* con le feci in modo continuativo fino ad un massimo di sei settimane. Inoltre, si sono osservati casi di animali che hanno eliminato *B. hyodysenteriae* in momenti diversi, anche a distanza di dieci settimane uno dall'altro. La presenza di diarrea associata ad escrezione si è osservata per un massimo di due prelievi consecutivi, ma in alcuni casi si è registrata nello stesso animale a distanza anche di dieci settimane. Questi dati sottolineano la mancata correlazione tra la SD e una precisa fascia di età, a differenza di quanto si osserva per altre infezioni che colpiscono i suini da ingrasso, confermando quanto descritto da Patterson (5). La correlazione all'esame colturale tra la presenza di *B. hyodysenteriae* e la valutazione della sostanza secca fecale di categoria 3 e 4 (suini sintomatici) è stata di circa il 30%; nel 70% dei casi si è osservata una escrezione di *B. hyodysenteriae* senza la presenza di diarrea.

Un aspetto che accomuna l'andamento della infezione nell'allevamento all'ingrasso e nelle riproduttrici (14) è la presenza di una clusterizzazione spaziale della infezione; infatti, animali appartenenti allo stesso box e nello stesso capannone hanno mostrato escrezione nello stesso periodo.

In questo contesto appare evidente la necessità di misure di controllo della SD non basate sul trattamento antimicrobico. Infatti questi non sono spesso più efficaci per la presenza di ceppi multi-resistenti, mentre l'uso indiscriminato di antibiotici sta divenendo inaccettabile per ragioni di sanità pubblica, legate alla necessità di contenere l'antibiotico-resistenza.

| Categorie di sostanza secca fecale | Campioni di feci positivi per <i>B. hyodysenteriae</i> (%) |
|------------------------------------|--|
| 1                                  | 39 (59.1)  |
| 2                                  | 5 (7.6)  |
| 3                                  | 11 (16.7)  |
| 4                                  | 9 (13.6)   |
| Non eseguiti                       | 2 (3)  |
| <b>Totale</b>                      | <b>66 (100)</b>  |

Tabella 1: distribuzione dei campioni di feci positivi per *B. hyodysenteriae* all'esame batteriologico, suddivisi per categoria di sostanza secca. Tra parentesi il valore in percentuale (%). I campioni che rientrano nella categoria dei 'non eseguiti' si riferiscono a quei casi in cui lo scarso contenuto della ampolla rettale non ha consentito l'esecuzione del test.

|      |     | LEGENDA:  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|------|-----|---|-----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|
|      |     | ● Suino positivo per <i>B. hyodysenteriae</i> /presenza diarrea |                 |   |   |   |   |   |   |   |   | ○ Suino negativo per <i>B. hyodysenteriae</i> |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | ● Suino positivo per <i>B. hyodysenteriae</i> /assenza diarrea  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   | ● Capo non campionato                         |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| Cap. | Box | ID  | NUMERO PRELIEVI |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     |   | 1               | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10  | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 |  |
| 1    | 3   | 1   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 2   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 3   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 4   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 5   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 11  | 6   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 7   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 8   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 9   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 10  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 11  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 12  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 13  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 14  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 15  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 19  | 16  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 17  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 18  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 19  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 20  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 27  | 21  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 22  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 23  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 24  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 25  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| 5    | 26  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 27  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 28  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 29  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 30  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 14  | 31  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 32  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 33  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 34  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      |     | 35  |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| 23   | 36  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 37  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 38  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 39  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 40  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| 31   | 41  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 42  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 43  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 44  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 45  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
| 31   | 46  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 47  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 48  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 49  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |
|      | 50  |   |                 |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  |

Griglia 1: sono indicati i prelievi, il capannone di appartenenza e relativi box dei suini campionati.

| <b>Identificativo<br/>Campione</b> | <b>n. copie di DNA/<br/>g di feci</b> | <b>Colturale</b> | <b>S.S.%</b> |
|------------------------------------|---------------------------------------|------------------|--------------|
| 1                                  | 7,82*10 <sup>4</sup>                  | pos              | 1            |
| 3                                  | 1,07*10 <sup>6</sup>                  | pos              | 1            |
| 4                                  | 4,58*10 <sup>5</sup>                  | pos              | 1            |
| 6                                  | 4,47*10 <sup>4</sup>                  | pos              | 1            |
| 7                                  | 4,07*10 <sup>6</sup>                  | pos              | 3            |
| 16                                 | 8,65*10 <sup>4</sup>                  | neg              | 1            |
| 21                                 | 1,31*10 <sup>5</sup>                  | neg              | 1            |
| 24                                 | 1,67*10 <sup>5</sup>                  | pos              | 3            |
| 32                                 | 4,51*10 <sup>6</sup>                  | pos              | 1            |
| 34                                 | 1,19*10 <sup>7</sup>                  | pos              | 4            |
| 35                                 | 5,03*10 <sup>7</sup>                  | pos              | 2            |
| 37                                 | 2,60*10 <sup>6</sup>                  | pos              | 4            |
| 6                                  | 7,96*10 <sup>3</sup>                  | pos              | 4            |
| 38                                 | 1,31*10 <sup>4</sup>                  | pos              | 1            |
| 39                                 | 8,15*10 <sup>5</sup>                  | pos              | 1            |
| 14                                 | 6,46*10 <sup>4</sup>                  | pos              | 1            |
| 41                                 | 4,54*10 <sup>6</sup>                  | neg              | 4            |
| 43                                 | 1,61*10 <sup>5</sup>                  | neg              | 1            |

Tabella 2: sono indicati i campioni positivi in PCR real-time per *B. hyodysenteriae*, l'animale di provenienza, il relativo esito dell'esame colturale e la categoria di sostanza secca fecale. È indicata la stima delle copie di DNA/g di feci dopo quantificazione.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Hampson D.J., La T., Adler B., Trott D.J. (2006) "Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins." *Microbiology* 152:1-2.
2. Råsbäck T., Fellström C., Bergsjø B., Cizek A., Collin K., Gunnarsson A., Jensen S.M., Mars A., Thomson J., Vyt P., Pringle M. (2005) "Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test." *Vet Microbiol.* 109(3-4):229-43.
3. Alvarez-Ordóñez A., Martínez-Lobo F.J., Arguello H., Carvajal A., Rubio P. (2013) "Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease." *Int J Environ Res Public Health.* 10;10(5):1927-47.
4. Merialdi G. "Coliti da *Brachyspira*" in "Le patologie del maiale" (2013) 1a edizione. Point VeterinaireItalieEditore.

5. Patterson A.H., Rubin J.E., Fernando C., Costa M.O., Harding J.C., Hill J.E. (2013) "Fecal shedding of *Brachyspira* spp. on a farrow-to-finish swine farm with a clinical history of "Brachyspirahampsonii-associated colitis." *BMC Vet Res.* 11, 9-137.
6. Pedersen K.S., Stege H., Nielsen J.P. (2011) "Evaluation of a microwave method for dry matter determination in faecal samples from weaned pigs with or without clinical diarrhoea." *Prev Vet Med.* 100, 163-170.
7. Sebastiani C., Cucco L., Ciullo M., Maresca C., Scoccia E., Tartaglia M., Magistrali C.F. (2013) "Valutazione di un test di PCR real-time per la diagnosi delle enteriti batteriche del magronaggio ed ingrasso." *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini* 203-211
8. La T., Collins A.M., Phillips N.D., Oksa A., Hampson D.J. (2006) "Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces." *Lett Appl Microbiol.* 42(3):284-8.
9. Francis D.H. (2002) "Enterotoxigenic *Escherichia Coli* infection in pig and its diagnosis." *J. Swine Health Prod.*, 10 (4)171-175.
10. Jones GF, Ward GE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ. (1993) "Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, *ilealsymbiontintracellularis*, in feces by polymerase chain reaction." *J Clin Microbiol.* 31(10):2611-5.
11. Rohde J., Klessner M., Baums C.G., Amtsberg G. (2004) "Comparison of methoSD for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany." *Vet. Microbiol* 19;102(1-2):25-32.
12. Ronne H., Szancer J. (1990) "In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemiotherapeutics". In: *Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, Lausanne, Switzerland*, 126.
13. Willems H., Reiner G. (2010) "A multiplex PCR real-time for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspirahyodysenteriae*, *Brachyspirapilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 205-209.
14. Cucco L., Chiancone F.M., Dettori A., Boriosi G., Sebastiani C., Pezzotti G., Magistrali C.F. (2014) "Studio trasversale sull'eliminazione fecale di *B. hyodysenteriae* in un allevamento di scrofe endemicamente infetto." *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini* 153-160.
15. Barcellos DE, Mathiesen MR, de Uzeda M, Kader II, Duhamel GE. (2000) "Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil." *Vet Rec.* 146(14):398-403.
16. Biksi I, Lorincz M, Molnár B, Kecskés T, Takács N, Mirt D, Cizek A, Pejsak Z, Martineau GP, Sevin JL, Szenci O. (2007) "Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs." *Acta Vet Hung.* 2007 Jun; 55(2):219-27.
17. 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.
18. Greiner M., Gardner I.A. (2000) "Epidemiologic issues in the validation of veterinary diagnostic tests." *Prev Vet Med.* 45(1-2):3-22.



# RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI SALMONELLA TYPHIMURIUM E DELLA SUA VARIANTE MONOFASICA ISOLATI DA SUINI IN ACCRESCIMENTO

D'INCAU M.<sup>[1]</sup>, GRASSI A.<sup>[1]</sup>, GIOVANNINI S.<sup>[1]</sup>, SALOGNI C.<sup>[1]</sup>, ZANONI M.<sup>[1]</sup>,  
RUGGERI J.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[2]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia – Romagna ~ Brescia  
~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Superiore di Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: Salmonella typhimurium, zoonosis, antimicrobial resistance

## Riassunto

Da indagini batteriologiche, eseguite nel periodo 2012 – 2014, su campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino sono stati isolati 245 ceppi di Salmonella typhimurium di cui 202 appartenenti alla sua variante monofasica. Per tutti i ceppi è stata valutata la sensibilità in vitro agli antimicrobici con il metodo Kirby – Bauer. I risultati ottenuti mettono in evidenza il tipo fondamentale di multiresistenza già riscontrato in precedenti lavori (amoxicillina, tetraciclina, streptomicina e sulfonamidi). Inoltre, il 24,49% degli isolati è risultato resistente a 10 o più molecole contemporaneamente.

## Abstract

245 strains of Salmonella typhimurium (202 belonging to its monophasic variant) were isolated in the period 2012 - 2014, from fecal samples, viscera, lymph nodes and pig carcasses. All strains were tested in vitro for antimicrobial susceptibility by Kirby – Bauer method. The results highlight the fundamental type of multidrug resistance showed in previous works (amoxicillin, tetracycline, streptomycin, sulfonamides). Furthermore, 24,49% of the isolates were resistant to 10 or more antibiotics.

## INTRODUZIONE:

Le infezioni da Salmonella rappresentano in tutti i paesi industrializzati una delle principali zoonosi a trasmissione alimentare (7). Nel suino l'isolamento di questo patogeno non è infrequente e, spesso, il suo riscontro avviene in assenza di un rilievo clinico.

Accanto al monitoraggio dei sierotipi circolanti assume una notevole importanza il monitoraggio dell'antibiotico – resistenza, dati gli attuali orientamenti sull'utilizzo mirato degli antimicrobici volto a una riduzione del loro impiego. La presenza, la diffusione e l'emergenza di cloni batterici multiresistenti, che costituiscono uno dei problemi di sanità pubblica emergenti e di maggiore interesse, sono stati riportati con sempre maggiore frequenza nei decenni recenti: tra questi vanno annoverati i fagotipi DT 193 e DT 104 di Salmonella typhimurium (ST), presenti fino dagli anni 1980, e, in anni recenti, la variante monofasica di Salmonella typhimurium (STVM). Quest'ultima è stata isolata con sempre maggiore frequenza a partire dai primi anni 2000 (5) e, nell'ambito della specie suina, costituisce il sierotipo con la maggiore prevalenza.

Scopo di questo lavoro è quello di fornire una panoramica sull'andamento della sensibilità in vitro di alcuni dei principali antibiotici utilizzati nell'allevamento suino e nel trattamento delle infezioni da Enterobacteriaceae con particolare riguardo a Salmonella typhimurium e alla sua variante monofasica.

## **MATERIALI E METODI:**

Per valutare l'antibiotico resistenza di ceppi di *Salmonella typhimurium* (4,[5],12:i:1,2) e della sua variante monofasica (4,[5],12:i:-), nel periodo compreso fra il 2012 ed il 2014, i campioni di feci, visceri, linfonodi e carcasse di suino in accrescimento, pervenuti presso la Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER), per indagini batteriologiche ed anatomopatologiche, sono stati analizzati per ricerca di *Salmonella* spp. Nel periodo indicato sono stati isolati n. 43 ceppi di ST e n. 202 ceppi di STVM. L'isolamento è stato effettuato con la metodica contemplata dalla norma ISO 6579 (1), prevista nell'ambito dell'attuazione dei piani di monitoraggio e controllo di *Salmonella* a livello di produzioni primarie. Questa metodica prevede i seguenti passaggi: arricchimento in acqua peptonata tamponata, pre – arricchimento selettivo in terreno semisolido e isolamento selettivo – differenziale in terreno solido in piastra.

L'identificazione di specie si è basata sulla valutazione delle caratteristiche colturali su terreno in piastra seguite da quelle su terreno differenziale su slant (Triple Sugar Iron agar, TSI), sulle caratteristiche biochimiche e sulla conferma finale mediante agglutinazione con antisiero anti – *Salmonella* poliagglutinante. La caratterizzazione sierologica completa di *Salmonella* è stata eseguita mediante agglutinazione rapida su vetrino per la determinazione degli antigeni somatici, mentre per la determinazione degli antigeni flagellari è stato applicato il metodo di agglutinazione lenta a caldo secondo la tecnica Spicer (12), modificata da Edwards (6) e Morris et al. (11). Gli esiti delle determinazioni degli antigeni sono stati poi impiegati per la caratterizzazione sierologica definitiva per la quale è stato utilizzato lo schema di Kauffmann – White – Le Minor (8).

I ceppi identificati come ST e come STVM sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità in vitro nei confronti di 24 antimicrobici che comprendono i principali antibatterici impiegati nell'allevamento suino e quelli previsti per il trattamento delle infezioni sostenute da Enterobacteriaceae.

Il test di sensibilità agli antibatterici è stato eseguito con la metodica Kirby Bauer (2, 3). La lettura degli aloni di inibizione è stata fatta in doppio con il sistema automatizzato Sirscan 2000 e con la lettura manuale.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

I risultati ottenuti sono riportati nella tabella 1 e sono espressi come percentuale di ceppi risultati sensibili, intermedi e resistenti al test in vitro eseguito utilizzando i 24 antimicrobici selezionati nel periodo 2012 – 2014.

**Tabella 1**

|                               | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Amoxicillina                  | 5,71%    | 0,41%    | 93,88%   |
| Amoxicillina + A. clavulanico | 74,46%   | 16,88%   | 8,66%    |
| Apramicina                    | 85,39%   | 1,37%    | 13,24%   |
| Cefalotina                    | 60,00%   | 24,08%   | 15,92%   |
| Cefquinome                    | 90,18%   | 5,36%    | 4,46%    |
| Ceftiofur                     | 65,57%   | 29,10%   | 5,33%    |
| Colistina                     | 91,43%   | 4,90%    | 3,67%    |
| Danofloxacin                  | 83,27%   | 15,51%   | 1,22%    |
| Doxiciclina                   | 4,22%    | 2,95%    | 92,83%   |
| Enrofloxacin                  | 71,49%   | 12,81%   | 15,70%   |
| Gentamicina                   | 70,61%   | 7,76%    | 21,63%   |
| Kanamicina                    | 48,98%   | 29,80%   | 21,22%   |
| Marbofloxacin                 | 93,42%   | 3,70%    | 2,88%    |
| Neomicina                     | 1,22%    | 51,84%   | 46,94%   |
| Sulfadiazina                  | 2,04%    | 0,41%    | 97,55%   |
| Tetraciclina                  | 2,45%    | 2,45%    | 95,10%   |
| Sulfonamidi + Trimethoprim    | 77,55%   | 1,22%    | 21,22%   |
| Acido Nalidixico              | 52,50%   | 28,75%   | 18,75%   |
| Amikacina                     | 67,76%   | 16,73%   | 15,51%   |
| Cefazolina                    | 60,82%   | 26,53%   | 12,65%   |
| Cefotaxime                    | 86,31%   | 7,88%    | 5,81%    |
| Cloramfenicolo                | 53,28%   | 4,51%    | 42,21%   |
| Spectinomicina                | 49,38%   | 23,46%   | 27,16%   |
| Streptomicina                 | 4,08%    | 4,49%    | 91,43%   |

Dal riepilogo dei risultati è evidenziabile un'elevata percentuale di ceppi resistenti (oltre 90% dei ceppi) a amoxicillina, doxiciclina, tetraciclina, streptomicina e sulfonamidi. Altre molecole in cui si riscontra un'elevata percentuale di ceppi resistenti sono individuabili in neomicina (46,94% dei ceppi) e cloramfenicolo (42,21% dei ceppi); per gli altri antibiotici testati si rilevano percentuali di ceppi resistenti inferiori al 30%. Nella tabella 2 sono indicati i conteggi dei ceppi di ST e STVM in relazione al numero di resistenze riscontrate contemporaneamente in un singolo ceppo (multiresistenza). In particolare, esaminando le singole classi di multiresistenza, si rileva che quelle maggiormente rappresentate sono quelle con 5 (43 ceppi), 6 (47 ceppi) e 7 (32 ceppi) resistenze includenti complessivamente circa la metà dei ceppi testati (n = 122). In particolare i pattern più rappresentati sono quello comprendente amoxicillina, doxiciclina, tetraciclina, streptomicina e sulfonamidi (32 ceppi di cui 25 appartenenti alla variante monofasica) e quello comprendente gli stessi cinque antibiotici a cui si aggiunge la neomicina (18 ceppi, tutti appartenenti alla variante monofasica).

**Tabella 2**

| <b>N. resistenze</b> | <b>Conteggio ceppi</b> |           |               |
|----------------------|------------------------|-----------|---------------|
|                      | <b>STVM</b>            | <b>ST</b> | <b>TOTALE</b> |
| <b>0</b>             |                        | 1         | 1             |
| <b>2</b>             | 2                      | 1         | 3             |
| <b>3</b>             |                        | 1         | 1             |
| <b>4</b>             | 10                     |           | 10            |
| <b>5</b>             | 35                     | 8         | 43            |
| <b>6</b>             | 42                     | 5         | 47            |
| <b>7</b>             | 31                     | 1         | 32            |
| <b>8</b>             | 20                     | 5         | 25            |
| <b>9</b>             | 20                     | 3         | 23            |
| <b>10</b>            | 13                     | 7         | 20            |
| <b>11</b>            | 9                      | 7         | 16            |
| <b>12</b>            | 8                      |           | 8             |
| <b>13</b>            | 4                      | 1         | 5             |
| <b>14</b>            | 2                      | 1         | 3             |
| <b>15</b>            | 3                      | 1         | 4             |
| <b>16</b>            | 2                      | 1         | 3             |
| <b>18</b>            | 1                      |           | 1             |
|                      | <b>202</b>             | <b>43</b> | <b>245</b>    |

I risultati esposti rivelano e confermano la netta prevalenza di STVM su ST: questo dato concorda con quello di altri studi (9) che riconoscono nel suino una delle principali fonti di questa sierovariante.

I risultati relativi all'antibiotico – resistenza mettono in evidenza il tipo fondamentale di multiresistenza: amoxicillina, tetraciclina, streptomina e sulfonamidi; questo pattern rappresenta il tratto fondamentale e caratteristico della resistenza agli antimicrobici dei sierotipi oggetto dell'indagine, come già evidenziato in numerosi studi sull'argomento (4, 10). Su questo profilo di base si inseriscono altre resistenze che conferiscono al ceppo caratteristiche di resistenza estesa: nel nostro caso un significativo numero di ceppi (60 in totale, corrispondente al 24,49% degli isolati) è risultato resistente a 10 o più molecole contemporaneamente. In particolare elevate percentuali di resistenza si registrano a carico di cloramfenicolo e neomicina.

Rispetto a un precedente lavoro (13) vi è la conferma del profilo di base di resistenza così come vi è la riprova di un'elevata percentuale di ceppi resistenti alla doxiciclina e un significativo apporto dei ceppi resistenti al cloramfenicolo. Da rilevare l'incremento dei ceppi resistenti a neomicina che annovera inoltre un'elevata percentuale di ceppi a sensibilità intermedia.

Alla luce di quanto esposto va ribadita la necessità di utilizzare un protocollo diagnostico che preveda l'esecuzione del test di sensibilità in vitro sul ceppo isolato in corso di patologia soprattutto in episodi ad eziologia multipla. Il dato di laboratorio ha, come sempre, un valore indicativo ai fini di un corretto approccio terapeutico. Inoltre va sottolineata l'importanza del

fatto che il veterinario pratico sia a conoscenza dei dati di laboratorio (visti quali elementi indicativi dell'evoluzione dell'antibiotico – resistenza) in modo da poter procedere con tempestività alla scelta dell'impiego di antibiotici o dei prodotti alternativi ad azione antimicrobica per il controllo di ST e STVM nel suino in accrescimento.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. ISO 6579:2002/Amd.1:2007 (2007) 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
2. NCCLS M2-A8 (2003) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard, 8th ed. NCCLS, Wayne
3. NCCLS M100-S14 (2004) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14th informational supplement. NCCLS, Wayne
4. Argüello H., Sørensen G., Carvajal A., Baggesen D.L., Rubio P., Pedersen K. (2014) Characterization of the Emerging *Salmonella* 4,[5],12:i:- in Danish Animal Production. *Foodborne Pathog Dis* 11: 366-372
5. Dionisi A.M., Graziani C., Lucarelli C., Filetici E., Villa L., Owczarek S., Caprioli A., Luzzi I. (2009) Molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and monophasic variant (S. 4,[5],12:i:-) isolated from human infections in Italy. *Foodborne Pathog Dis* 6:711-717;
6. Edwards P.R. (1962) Serologic examination of *Salmonella* cultures for epidemiologic purposes. Public Health Service Publication. National Communicable Disease Center, Atlanta
7. EFSA (2013) The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. *EFSA J* 11: 3129
8. Grimont P.A.D., Weill, F.-X. (2007) Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars (9th ed.) WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris
9. Hopkins K.L., de Pinna E., Wain J. (2012) Prevalence of *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in England and Wales, 2010. *Euro Surveill* 17: pii = 20275
10. Lucarelli C., Dionisi A.M., Torpdahl M., Villa L., Graziani C., Hopkins K., Threlfall J., Caprioli A., Luzzi I. (2010) Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. *J Clin Microbiol* 48: 2103-2109
11. Morris G.K., Steele C.D., Wells, J.G. (1972) Evaluation of plastic multi-well plates for serological screening of *Salmonella* cultures with Spicer-Edwards pooled antisera. *Appl Microbiol* 24: 846-848
12. Spicer C.C.(1956) A quick method of identifying *Salmonella* H antigens. *J Clin Pathol* 9:378-379
13. Zanoni M., Guadagnini G., Gradassi M., Salogni C., D'Incau M., Alborali L. (2008) Indagine preliminare sull'antibiotico resistenza in ceppi di *Salmonella typhimurium* isolati da suino nel periodo 2005-2007. *Atti Soc Ital Patol Allev Suini, XXXIV Meeting Annuale*: 315-318



# MYCOPLASMA HYORINIS, HAEMOPHILUS PARASUIS E CO-INFEZIONI BATTERICHE NELLE POLISIEROSITI DEL SUINO

SALOGNI C.<sup>[1]</sup>, LAZZARO M.<sup>[1]</sup>, GIOVANNINI S.<sup>[1]</sup>, GIULIANI M.<sup>[1]</sup>, GIACOMINI E.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[2]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: Mycoplasma hyorhinis, Haemophilus parasuis, polyserositis

## Riassunto

Scopo del presente lavoro è quello di valutare le associazioni tra infezioni con Haemophilus parasuis and Mycoplasma hyorhinis ed altri patogeni batterici in suini che all'esame anatomico patologico presentavano polisierosite. Sono stati individuati 74 soggetti appartenenti a tre diverse fasi di allevamento così suddivise: 49 svezzamento (76%), 17 magronaggio (16%) e 8 sottoscrofa (8%). Da ogni soggetto sono state effettuate indagini batteriologiche e PCR. E' stato riscontrato H. parasuis in 37 casi (58%), M. hyorhinis in 31 (48%), Streptococcus sp. In 20 (31%), Pasteurella multocida in 12 (19%), Escherichia coli in 9 (14%), Actinobacillus pleuropneumoniae in 8 (13%) e Actinomyces pyogenes in 2 (3%). E' stato inoltre riscontrato un elevato numero di coinfezioni. Questo è stato particolarmente evidente per M. hyorhinis (87 %) ed H. parasuis (57%). Non è stata invece osservata nessuna relazione tra microrganismo evidenziato, categoria di animali colpiti e sierosa colpita.

## Abstract

Polyserositis is identified as an inflammation fibrinous or fibrinous-purulent frequently but not exclusively related to infection by Haemophilus parasuis and Mycoplasma hyorhinis. The most affected animals, in more virulent and acute form, are typically pigs in the weaning phase and to a lesser extent the growing-finishing. The objective of this study is to determine the associations among H. parasuis, M. hyorhinis and bacterial pathogens in 74 pigs with polyserositis. 49 post-weaning pigs (76%), 17 growing-finishing (16%) and 8 piglets (8%) were included. From each one we sampled swabs and tissues for further bacteriological and PCR investigations. It has been observed H. parasuis in 37 cases (58%), M. hyorhinis in 31 (48%), Streptococcus sp. In 20 (31%), Pasteurella multocida in 12 (19%), Escherichia coli in 9 (14%), Actinobacillus pleuropneumoniae in 8 (13%) and Actinomyces pyogenes in 2 (3%). It has been observed a high number of co-infections. This was particularly evident for M. hyorhinis (87%) and H. parasuis (57%). It was however observed no relationship between pathogen, category of affected animals or affected serosa.

## INTRODUZIONE:

L'evoluzione della gestione dell'allevamento suino e l'incremento delle produzioni hanno contribuito all'aumento della Malattia di Glässer, sostenuta da Haemophilus parasuis che da commensale del tratto superiore del apparato respiratorio in opportuna condizione può causare una patologia sistemica caratterizzata da polisierosite, artrite e meningite (1). Con il termine di polisierositi vengono identificate le infiammazioni fibrinose o fibrinoso-purulente prevalentemente a carico delle sierose (pleura, pericardio e peritoneo) che possono essere associate ad artriti, meningiti e broncopolmoniti e che interessano il suino in accrescimento. Per la diagnosi differenziale devono essere prese in considerazione le infezioni da Mycoplasma hyorhinis, un patogeno in grado di causare polisierosite, artrite e polmonite clinicamente

difficilmente distinguibile dalla Malattia di Glässer (6). In letteratura è riportata l'associazione tra *H. parasuis*, *M. hyorhinis* con il virus della Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRSV) (6) ed altri parogeni batterici quali *Streptococcus* sp. (4) ed *Escherichia coli* (7). Il riscontro di polisierosite nella sua fase acuta è tipica dei suini allevati allo svezzamento ed, in minor misura, al magronaggio. Lesioni croniche come aderenze e coalescenze sono spesso riscontrabili come reperto di esame autoptico e di macellazione. In un gruppo di soggetti colpiti da polisierosite la maggiore evidenza clinica è rappresentata da un aumento della mortalità e dell'incidenza dei suini che dimagriscono, spesso con problemi respiratori, distensione addominale e tumefazioni articolari. Scopo del lavoro è valutare le associazioni tra infezioni tra *H. parasuis*, *M. hyorhinis* ed altri patogeni batterici in suini che all'esame anatomo patologico presentavano polisierosite.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Campionamento**

Nel 2014 sono stati individuati 74 soggetti che all'esame autoptico mostravano lesioni riferibili a polisierosite. I suini conferiti alla Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER) provenivano da 39 allevamenti con problemi storici di polisierosite. Per ogni soggetto sono stati valutati lo stato di nutrizione e la fase di allevamento da cui provenivano. I suini sono stati sottoposti ad esame autoptico riportando in particolare le sierose interessate (pleura, pericardio e peritoneo), l'associazione con lesioni polmonari, articolari e meningee. Sono stati selezionati suini con segni clinici tipici e che presentavano almeno due sierose interessate. Da questi stessi soggetti sono stati prelevati campioni e sottoposti ad esame batteriologico ed indagini di biologia molecolare mediante PCR.

### **Esame batteriologico**

Da ogni soggetto incluso nello studio sono stati effettuati tamponi di sierosa pleurica, pericardica, peritoneale e sinovia articolare nonché prelievi di tessuto polmonare, renale, splenico e cerebrale che sono stati poi seminati. L'esame batteriologico è stato effettuato secondo le tecniche standardizzate presso il Laboratorio. L'identificazione dei microrganismi isolati è stata effettuata seguendo le procedure microbiologiche standard (3)

### **Indagine di biologia molecolare mediante PCR**

Dai tamponi e da porzioni di sierosa, pleurica, pericardica e peritoneale sono state eseguite PCR specifiche per la ricerca di *H. parasuis* e *M. hyorhinis*. L'estrazione del DNA totale del campione è stata effettuata con l'utilizzo di un kit a colonnine di affinità per il DNA. Le singole reazioni di amplificazione (PCR di tipo end-point) prevedono l'utilizzo di due coppie di primers specifiche in grado di amplificare una regione codificante l'rRNA 16S di *H. parasuis* (5) e una tratto codificante la proteina p37 di *M. hyorhinis* (2).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

### **RISULTATI**

Nel periodo considerato sono stati arruolati nello studio 74 soggetti con polisierosite appartenenti a tre diverse fasi di allevamento così suddivise: 49 svezzamento (76%), 17 magronaggio (16%), 8 sottoscrofa (8%).

Nella Tabella 1 sono riportate le sierose interessate e le loro associazioni riscontrate durante l'esame necroscopico.

Le lesioni riscontrate in sede autoptica hanno riguardato prevalentemente la pleura (70 casi), seguita dal pericardio (40 casi), peritoneo (24 casi). Le associazioni di sierose individuate nei singoli soggetti sono: pleuriti e pericarditi (37 casi), pleuriti e peritoniti (12 casi), pericarditi e peritoniti (20 casi), pleurite, pericardite e peritonite (19 casi). In 12 casi è stata riscontrata anche una poliartrite sierofibrinosa. La polmonite era presente in 44 dei

74 soggetti esaminati.

La tabella 2 mostra i risultati dell'esame batteriologico e della PCR mettendo in evidenza le osservazioni in purezza, in associazioni tra loro e la sede dell'isolamento.

Le indagini di laboratorio hanno consentito di individuare la positività per almeno un agente eziologico in 64 casi su 74. In particolare è stato riscontrato *H. parasuis* in 37 casi (58%), *M. hyorhinis* in 31 casi (48%), *Streptococcus* sp. in 20 casi (31%), *Pasteurella multocida* in 12 casi (19%), *Escherichia coli* in 9 casi (14%), *Actinobacillus pleuropneumoniae* in 8 casi (13%) e *Actinomyces pyogenes* in 2 casi (3%).

## DISCUSSIONE

I risultati dello studio hanno permesso di individuare nella fase di svezzamento il momento più critico per la comparsa di quadri di polisierosite (66% dei riscontri). Tuttavia il problema è presente anche nella fase magronaggio e, sebbene in minor misura, anche in sala parto. È noto che le particolari situazioni di stress a cui sono sottoposti i suini proprio nella fase di svezzamento e la frequente presenza di PRRSV rappresentano fattori molto importanti che espongono i suinetti ad infezioni di patogeni fra i quali quelli responsabili di polisierosite. Nella fase di magronaggio tale evenienza è talvolta conseguenza della cronicizzazione di polisierositi del periodo dello svezzamento oppure è collegata con l'infezione *A. pleuropneumoniae* che ha coinvolto contemporaneamente pleura e pericardio. Il dato risulta invece più allarmante se si considerano i soggetti sottoscrofa. La spiegazione potrebbe essere legata a particolari fenomeni, non indagati nel presente lavoro, quali eventi stressanti ed immunodepressivi, elevata pressione ambientale o virulenza dei microrganismi coinvolti o a carenze profilattiche.

In merito all'esame autoptico una riflessione va fatta in considerazione di come difficilmente la patologia nota come polisierosite coinvolga contemporaneamente tutte le sierose. Infatti, dalle osservazioni effettuate, solo in una ridotta percentuale di casi (26%) si può parlare di polisierosite in senso stretto. Molto più frequenti sono invece gli interessamenti pleuropericardici (50%) rispetto a quelli peritoneali. Altre lesioni anatomopatologiche associate alla polisierosite sono state la polmonite presente in un numero significativo di casi (59%), mentre l'artrite è stata riscontrata meno frequentemente (18% dei casi).

Le indagini di laboratorio hanno permesso di individuare una positività nell'86% dei casi. I microrganismi più frequentemente evidenziati sono stati *H. parasuis* (58% dei casi) e *M. hyorhinis* (48% dei casi). A questo dato, concordante con quanto riportato in bibliografia, va a sommarsi, in proporzioni variabili, la presenza di altri microrganismi quali *Streptococcus* sp. (31%), *P. multocida* (19%), *E. coli* (14%), *A. pleuropneumoniae* (13%) e *A. pyogenes* (3%). In modo particolare si è osservata un elevato grado di associazione tra i diversi patogeni. Questo è particolarmente evidente con *M. hyorhinis* (87% dei casi) ed *H. parasuis* (57% dei casi). Se per *M. hyorhinis* è noto l'effetto sinergico nel determinare la comparsa della polisierosite quando in associazione con altri microrganismi quali *H. parasuis* (6), per quest'ultimo invece dovrebbe essere preso in considerazione anche la virulenza dei diversi sierotipi coinvolti (1). In merito alla localizzazione dei microrganismo isolati è da segnalare che per alcuni di essi il quadro di polisierosite si manifesti in associazione ad una setticemia. Tale evidenza riguarda soprattutto batteri come *E. coli* (100% dei casi) ed in minor misura *Streptococcus* sp. (45%). Altri microrganismi come *P. multocida*, *A. pleuropneumoniae* e *A. pyogenes* sono più legati a lesioni pleuropolmonari o pleuropericardiche. Non è stata osservata nessuna differenza significativa tra microrganismo evidenziato, categoria di animali colpita e sierosa/e coinvolta/e. L'ampliamento del numero di soggetti con polisierositi da arruolare nell'indagine e l'esame delle associazioni anche con patogeni virali ed in particolare con PRRSV consentirà di migliorare e completare lo studio.

| LESIONE       | TOTALE CASI | CASI ASS. A PLEURITI | CASI ASS. A PERICARDITI | CASI ASS. A PERITONITI |
|---------------|-------------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| PLEURITI      | 70 (95%)    | #                    | 37 (50%)                | 12 (16%)               |
| PERICARDITI   | 40 (54%)    | 37 (50%)             | #                       | 20 (27%)               |
| PERITONITI    | 24 (32%)    | 12 (16%)             | 20 (27%)                | #                      |
| POLISIEROSITI | 19 (26%)    | #                    | #                       | #                      |
| POLIARTRITI   | 13 (18%)    | #                    | #                       | #                      |
| POLMONITI     | 44 (59%)    | #                    | #                       | #                      |

Tabella 1 - Distribuzione ed associazioni delle lesioni osservate in sede autoptica  
Table 1 – Distribution and relationships among detected gross lesions

| MICROORGANISMO                         | TOTALE RILEVAMENTI | FORMA BATTERICA PURA | FORMA BATTERICA ASSOCIATA | LOCALIZZAZIONE PLEUROPOLMONARE | SETTICEMIA |
|--|--------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------------|------------|
| <i>Haemophilus parasuis</i>            | 37 (58%)           | 16 (43%)             | 21 (57%)                  | #                              | #          |
| <i>Mycoplasma hyorhinis</i>            | 31 (48%)           | 4 (13%)              | 27 (87%)                  | #                              | #          |
| <i>Streptococcus sp.</i>               | 20 (31%)           | 13 (65%)             | 7 (35%)                   | 11 (55%)                       | 9 (45%)    |
| <i>Pasteurella multocida</i>           | 12 (19%)           | 6 (50%)              | 6 (50%)                   | 9 (75%)                        | 3 (25%)    |
| <i>Escherichia coli</i>                | 9 (14%)            | 6 (67%)              | 3 (33%)                   | 0 (0%)                         | 9 (100%)   |
| <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> | 8 (13%)            | 6 (75%)              | 2 (25%)                   | 8 (100%)                       | #          |
| <i>Actinomyces pyogenes</i>            | 2 (3%)             | 1 (50%)              | 1 (50%)                   | 1 (50%)                        | 1 (50%)    |

Tabella 2 - Rilevamenti batterici, loro associazione e localizzazione  
Table 2 - Bacteria detection, relationships and localization

## BIBLIOGRAFIA:

1. Aragon V., Cerda-Cuellar M., Fraile L., Mombarg M., Nofrarias M., Olvera A., Sibila M., Solanes D. and Segales J., 2010. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus parasuis* field strains. *Veterinary Microbiology*. Vol. 142 (issue 3-4); pag. 387-393.
2. Caron J., Ouardani M. and Dea S., 2000. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 38 (issue 4); pag. 1390-1396.
3. Carter G.R. and Cole Jr J.R. 2012 *Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology*: Academic Press.
4. Kim D., Han K., Oh Y., Kim C.H., Kang I., Lee J., Gottschalk M. and Chae C., 2010. Distribution of capsular serotypes and virulence markers of *Streptococcus suis* isolated from pigs with polyserositis in Korea. *Canadian Journal of Veterinary Research-Revue Canadienne De Recherche Veterinaire*. Vol. 74 (issue 4); pag. 314-316.
5. Oliveira S., Galina L. and Pijoan C., 2001. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections. *J Vet Diagn Invest*. Vol. 13 (issue 6); pag. 495-501.
6. Palzer A., Haedke K., Heinritzi K., Zoels S., Ladinig A. and Ritzmann M., 2015. Associations among *Haemophilus parasuis*, *Mycoplasma hyorhinis*, and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infections in pigs with polyserositis. *Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne*. Vol. 56 (issue 3); pag. 285-287.
7. Waxler G.L. and Britt A.L., 1972. Polyserositis and arthritis due to *Escherichia coli* in gnotobiotic pigs. *Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee*. Vol. 36 (issue 3); pag. 226-33.

# CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE, TIPIZZAZIONE SIEROLOGICA E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGA TOSSINA (STEC) ISOLATI DA SUINI

BALDO V.<sup>[1]</sup>, D'INCAU M.<sup>[1]</sup>, SALOGNI C.<sup>[1]</sup>, GIOVANNINI S.<sup>[1]</sup>, ROSSI L.<sup>[2]</sup>,  
ACQUARONE F.<sup>[3]</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[4]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia ~ Brescia ~ Italy, <sup>[2]</sup>Dipartimento VESPA, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[3]</sup>Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Parma ~ Parma ~ Italy, <sup>[4]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: STEC, antimicrobial-resistance, biomolecular characterization

## Riassunto

L'obiettivo del lavoro è di valutare i profili di antibiotico-resistenza, le caratteristiche biomolecolari e sierologiche dei ceppi di Escherichia coli produttori di Shigatossina (STEC) isolati da suini in accrescimento con diarrea e sintomatologia riconducibile a malattia degli edemi. Sono stati isolati 50 ceppi di E. coli risultati essere produttori di Shigatossina STX2e provenienti da suini in svezzamento (72%) ed in magronaggio (26%). Le lesioni anatomo-patologiche riscontrate erano caratterizzate da edema (32%), enterite catarrale-emorragica (26%) ed enterite catarrale (24%) e linfadenite (6%). Il 92% dei ceppi di STEC hanno presentato il fattore fimbriale F18 e il 34% appartenevano al sierogruppo O139. Una elevata percentuale di ceppi è risultata essere resistente a Tetraciclina (92%), Amoxicillina (92%), Neomicina (90%), Doxicilina (90%), Sulfamidico/Trimethoprim (86%), Cefaloridina (82%), Sulfadiazina (82%). Il 74% dei ceppi STEC si sono dimostrati resistenti contemporaneamente ad un numero superiore a 9 antimicrobici e il 64% appartenenti alle classi di multiresistenza comprese tra 10 e 14.

## Abstract

The aim of this study is to determine the antimicrobial susceptibility profiles of Shiga-toxin producing Escherichia coli (STEC) isolated in growing pigs clinically affected by edema disease and diarrhea. 50 STEC strains have been isolated in weaning (72%) and growing-finishing pigs (26%) with anatomo-pathological lesions related to edema (32%), catarrhal-hemorrhagic enteritis (26%), catarrhal enteritis (24%) and lymphadenitis (6%). The STEC often have the F18 fimbrial factor (92%) and sometimes belong to serogroup O139 (34%). A high percentage of strains was resistant to Tetracycline (92%), Amoxicillin (92%), Neomycin (90%), Doxycycline (90%), Sulfonamide / Trimethoprim (86%), Cephaloridine (82%), Sulfadiazine (82%). 74% of STEC were simultaneously resistant to antimicrobials number greater than 9 and 64% is included in multidrug resistance patterns between 10 and 14.

## INTRODUZIONE:

I ceppi di Escherichia coli con potenziale patogeno sono distinti in patotipi intestinali ed extra intestinali. Nel primo patotipo sono inclusi i ceppi enterotossici (ETEC), enteropatogeni (EPEC), produttori di Shigatossina (STEC) che possono essere indicati come verocitotossici (VTEC) o enteroemorragici (EHEC), enteroaggregativi (EAEC),

enteroinvasivi (EIEC) e diffusamente aderenti (DAEC). Al patotipo extra intestinale appartengono i ceppi uropatogeni (UPEC), necrotossigeni (NTEC) e setticemici (SEPEC) (15). La patogenicità dei ceppi di E.coli è legata a diversi fattori quali la capacità adesiva, la produzione di tossine e l'antibiotico resistenza (3, 5). Nei ceppi di E. coli riconosciuti patogeni negli animali prevalgono gli antigeni fimbriali F4, F5, F6, F41, F18 (8, 19). Gli STEC sono oggi considerati importanti sia per la salute umana che per la sanità animale. Nell'uomo possono causare colite emorragica e sindrome emolitica generalizzata con uremia (SEU) e possono essere trasmessi per assunzione di cibo e acqua contaminati o per contatto diretto con soggetti infetti (6, 17). Negli animali sono responsabili di forme cliniche gravi enteriche e enterotossiemiche. I suini ed i ruminanti sono considerati rispettivamente potenziali "carrier" ad alta prevalenza (10%) e "reservoir" per i ceppi STEC trasmissibili all'uomo (16). L'abilità dei ceppi STEC a determinare malattia sia nell'uomo che negli animali è legata alla produzione di una o più tossine (16). Le tossine prodotte possono essere associate alla cellula batterica definite VT1 (STX1) ed esterne alla cellula batterica identificate come VT2 (STX2). Le tossine VT2 presentano numerose varianti fra le quali la STX2e, è considerata la più importante nel suino e responsabile della malattia degli edemi e della diarrea post-svezzamento. Scopo del presente lavoro è di valutare i profili di antibiotico-resistenza, le caratteristiche biomolecolari, sierologiche ed antigeniche dei ceppi STEC isolati da suini in accrescimento con diarrea e sintomatologia riferita a malattia degli edemi.

#### **MATERIALI E METODI:**

Durante l'attività diagnostica svolta presso la Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER) nel periodo 2013-2015 sono stati prelevati campioni di feci, di intestino e di linfonodi meseraici provenienti da suini in accrescimento che presentavano sintomatologia clinica enterica e enterotossiemica. Per ogni soggetto è stata individuata la fase di allevamento da cui provenivano. I suini sono stati sottoposti ad esame necroscopico riportando il quadro anatomopatologico macroscopico osservato: enterite catarrale, catarrale-emorragica, linfoadenite, presenza di edema del mesentere/ sottocutaneo della regione frontale/ della parete dello stomaco. I campioni sono stati analizzati mediante esame batteriologico ed i ceppi di E.coli isolati sono stati sottoposti a conferma di identificazione, caratterizzazione biomolecolare, sierotipizzazione e test di valutazione della sensibilità agli antimicrobici. L'esame batteriologico è stato effettuato secondo le tecniche standardizzate presso il Laboratorio. Il campione è stato direttamente seminato su terreno selettivo differenziale agar Mac Conkey e terreno agar globuli, incubati in aerobiosi a  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$  per 18-24 ore. Le colonie tipiche isolate su Mac Conkey sono state esaminate microscopicamente mediante colorazione di Gram, sottoposte a prove biochimico-enzimatiche ed identificate mediante gallerie di identificazione Api 20E, (bioMérieux). Il ceppo puro ottenuto su terreno BHI (Brain Heart Infusion) è stato sottoposto a caratterizzazione biomolecolare per la ricerca di antigeni codificanti le verocitotossine.

#### **Caratterizzazione biomolecolare e tipizzazione sierologica**

Tutti i ceppi batterici isolati sono stati identificati e caratterizzati a livello biomolecolare tramite tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) per la ricerca di antigeni codificanti verocitotossine VT1, VT2, VTe. Dopo una prima amplificazione di screening (VT universale) per la valutazione della presenza di geni codificanti per una o più varianti e a seguito di positività si è proceduto all'amplificazione specifica delle varianti VT1, VT2, VTe a partire dal DNA del microrganismo (9, 11, 18). Tutti i ceppi risultati positivi in PCR per la ricerca VTe sono stati testati per la ricerca di antigeni fimbriali F4, F5, F6, F18, F41.

La sierotipizzazione è stata effettuata con tecnica di agglutinazione lenta a caldo mediante l'uso di un pannello di trenta antisieri O gruppo-specifici (4, 7, 14, 20).

#### Test di sensibilità agli antimicrobici

Il test di sensibilità agli antimicrobici è stato effettuato utilizzando il terreno Mueller-Hinton secondo il metodo Kirby-Bauer, con i criteri descritti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (1, 2). È stato utilizzato un pannello di 22 antimicrobici che comprendeva i principali antibatterici impiegati nell'allevamento suino e quelli previsti per il trattamento delle infezioni sostenute da Enterobacteriaceae. Sono stati testati i seguenti antimicrobici: Amminosidina(60µg), Amoxicillina(25µg), Amoxicillina/Ac. Clavulanico(30µg), Apramicina(15µg), Cefaloridina (30µg), Cefquinome (30µg), Ceftiofur (30µg), Colistina (10µg), Danofloxacin (5µg), Doxiciclina (30µg), Enrofloxacin (5µg), Florfenicolo (30µg), Flumequina (30µg), Gentamicina (10µg), Kanamicina (30µg), Marbocyl (5µg), Neomicina (10µg), Penicillina (10µg), Sulfadiazina (0,25µg), Tetraciclina (30µg), Tiamulina (30µg), Sulfamidico/Trimethoprim (25µg). La lettura è stata effettuata mediante misurazione manuale degli aloni di inibizione. Gli isolati sono stati classificati in sensibili, intermedi e resistenti.

#### RISULTATI E DISCUSSIONE:

Sono stati identificati e tipizzati 50 ceppi di E. coli risultati essere produttori di Shiga-tossina STX2e. Tali ceppi sono stati isolati da suini in sala parto (n=1), in svezzamento (n=36) e in magronaggio (n=13).

Il quadro anatomopatologico macroscopico osservato è stato riconducibile ad enterite catarrale in 12 soggetti, ad enterite catarrale-emorragica in 13, 6 soggetti presentavano linfadenite e 16 edema.

#### Caratterizzazione biomolecolare e tipizzazione sierologica

In tabella 1 sono riportati i risultati della tipizzazione sierologica e delle indagini biomolecolari effettuate sui ceppi STEC per la ricerca dei fattori di virulenza fimbriali.

| ND          | SIEROGRUPPO |          |          |          |          |          |          |           |          |          |          | CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE |          |           |          |          |          |          |           |
|-------------|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|----------|---------------------------------|----------|-----------|----------|----------|----------|----------|-----------|
|             | O1          | O2       | O6       | O8       | O9       | O128     | O139     | O141      | O147     | O149     | O157     | VT1                             | VT2      | Vte       | F4       | F5       | F6       | F41      | F18       |
| 10          |             | 1        |          |          | 1        |          | 4        |           |          |          |          | 0                               | 0        | 16        | 0        | 0        | 0        | 0        | 14        |
| 9           |             |          |          |          |          |          | 6        |           |          |          |          | 0                               | 0        | 15        | 0        | 0        | 0        | 0        | 14        |
| 11          |             |          |          | 1        |          |          | 7        |           |          |          |          | 0                               | 0        | 19        | 0        | 0        | 0        | 0        | 18        |
| <b>TOT.</b> | <b>30</b>   | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | <b>0</b> | <b>17</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b>                        | <b>0</b> | <b>50</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>0</b> | <b>46</b> |

Tabella 1 - Tipizzazione sierologica e indagini biomolecolari in ceppi STEC Table 1 – Serotyping and biomolecular characterization in STEC

46 ceppi STEC presentavano fattore fimbriale F18 e tutti negativi per F4, F5, F6, F41. Il sierogruppo risultato più frequentemente associato a STEC è stato O139 (n=17) mentre altri sierogruppi quali O2, O8 e O9 sono risultati associati rispettivamente ad un singolo ceppo STEC. Va considerato che 30 ceppi sono risultati non appartenere ai sierogruppi ricercati. Test di sensibilità agli antimicrobici I risultati al test di sensibilità agli antimicrobici sono riportati nella tabella 2 e sono espressi come percentuale di ceppi risultati sensibili, intermedi e resistenti ai 22 antimicrobici selezionati.

|                               | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|-------------------------------|----------|----------|----------|
| Amminosidina                  | 40%      | 2%       | 58%      |
| Amoxicillina                  | 8%       | 0%       | 92%      |
| Amoxicillina + A. clavulanico | 52%      | 30%      | 14%      |
| Apramicina                    | 30%      | 2%       | 56%      |
| Cefalotina                    | 8%       | 10%      | 82%      |
| Cefquinome                    | 84%      | 0%       | 10%      |
| Ceftiofur                     | 88%      | 4%       | 6%       |
| Colistina                     | 44%      | 40%      | 16%      |
| Danofloxacin                  | 54%      | 32%      | 12%      |
| Doxiciclina                   | 6%       | 0%       | 90%      |
| Enrofloxacin                  | 70%      | 14%      | 14%      |
| Florfenicolo                  | 36%      | 6%       | 18%      |
| Flumequine                    | 60%      | 12%      | 28%      |
| Gentamicina                   | 32%      | 2%       | 66%      |
| Kanamicina                    | 22%      | 20%      | 58%      |
| Marbofloxacin                 | 88%      | 0%       | 12%      |
| Neomincina                    | 4%       | 6%       | 90%      |
| Penicillina                   | 0%       | 0%       | 100%     |
| Sulfadiazina                  | 10%      | 0%       | 82%      |
| Tetraciclina                  | 4%       | 2%       | 92%      |
| Tiamulina                     | 4%       | 4%       | 76%      |
| Sulfonamidi + Trimethoprim    | 2%       | 0%       | 86%      |

Tabella 2 – Sensibilità agli antimicrobici di STEC Table 2 – Antimicrobial sensitivity in STEC

Tutti i ceppi testati per la sensibilità agli antibatterici hanno presentato resistenza nei confronti della Penicillina. Una elevata percentuale di ceppi superiore al 90% è risultata essere resistente a Tetraciclina (92%), Amoxicillina (92%), Neomicina (90%), Doxiciclina (90%) mentre oltre l'80% sono risultati resistenti a Sulfamidi + Trimethoprim (86%), Cefaloridina (82%), Sulfadiazina (82%). Altre molecole in cui è stata riscontrata una percentuale di resistenza compresa tra il 50 e l'80% dei ceppi sono Tiamulina (76%), Gentamicina (66%), Kanamicina e Amminosidina (58%), Apramicina (56%). Una percentuale percentuali di ceppi resistenti inferiori al 20% sono Florfenicolo (18%), Colistina (16%), Amoxicillina + Ac. Clavulanico ed Enrofloxacin (14%), Danofloxacin e Marbofloxacin ( 12 % ), Cefquinome (10%), Ceftiofur (6%)

Nella tabella 3 sono indicati i conteggi dei ceppi di STEC resistenti contemporaneamente ad un determinato numero di antimicrobici (multiresistenza).

| <b>N. resistenze</b> | <b>Conteggio ceppi</b> |
|----------------------|------------------------|
| 5                    | 2                      |
| 6                    | 2                      |
| 7                    | 1                      |
| 8                    | 3                      |
| 9                    | 5                      |
| 10                   | 5                      |
| 11                   | 8                      |
| 12                   | 5                      |
| 13                   | 6                      |
| 14                   | 8                      |
| 15                   | 1                      |
| 16                   | 2                      |
| 17                   | 2                      |

Tabella 3 – Pattern di multiresistenza dei ceppi STEC Table 3 – Multidrug-resistant patterns of STEC strains

37 ceppi STEC sono risultati resistenti contemporaneamente ad numero superiore a 9 antimicrobici. Le classi di multiresistenza maggiormente rappresentate sono quelle rispettivamente con 11, 13, 14 antimicrobici.

#### Discussione

I 50 STEC sono stati isolati in suini provenienti dallo svezzamento (72%), magronaggio (26%) e solo in un caso da suinetti in sala parto (2%)

Il quadro anatomopatologico macroscopico osservato nei soggetti da cui sono stati isolati STEC era caratterizzato da edema (32%), enterite catarrale-emorragica (26%), enterite catarrale (24%), e linfadenite (6%).

I 92% dei ceppi STEC presentavano il fattore fimbriale F18 e appartevano al sierogruppo O139 (34%).

I risultati delle indagini di sensibilità agli antimicrobici hanno evidenziato che il 74% dei ceppi STEC si sono dimostrati resistenti contemporaneamente ad numero superiore a 9 antimicrobici. Il 64% dei ceppi isolati apparteneva alle classi di multiresistenza comprese tra 10 e 14. In particolare elevate percentuali di resistenza sono state registrate a carico di Penicillina, Tetraciclina, Neomicina, Amoxicillina, Doxiciclina, Sulfamidico potenziato a Trimethoprim, Cefaloridina, Sulfadiazina e Tiamulina.

Il pattern di multiresistenza risultato più frequente comprendeva Neomicina, Penicillina, Tetraciclina, Sulfadiazina, Amoxicillina e Sulfamidico potenziato a Trimethoprim. In aggiunta a questo la presenza di ulteriori resistenze quali Doxiciclina, Gentamicina, Kanamicina, Apramicina, Cefalotina e Tiamulina conferiva al ceppo caratteristiche di estesa resistenza.

I risultati ottenuti trovavano riscontro in recenti studi di antibiotico resistenza suina nei quali prevale resistenza nei confronti di Tetraciclina, Sulfamidico + Trimethoprim, Penicillina, Sulfadiazina, Gentamicina, Kanamicina (5, 16).

L'isolamento di ceppi STEC con fattore fimbriale F18 e multiresistenti in suini con sintomatologia tipica conferma l'importanza della diagnosi eziologica in episodi di enterite ed enterotossimia. La disponibilità di indagini di laboratorio specifiche consente di procedere

alla scelta dell'impiego di antimicrobici e di prevedere l'impostazione di programmi vaccinali specifici. Lo studio è da considerare preliminare e necessita di ulteriori approfondimenti diagnostici e clinici al fine di ampliare il numero dei ceppi STEC isolati e consentire una valutazione anche statistica delle loro caratteristiche antigeniche, dei fattori di virulenza e del profilo di resistenza agli antimicrobici. Lo studio è stato svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca "Vaccini orali nel suino" finanziato da MIUR- Regione Lombardia.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals"; Approved Standard, 3rd ed. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing"; 19th ed. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA.
3. Bischoff K. M., White D. G., McDermott P. F., Zhao S., Gaines S., Maurer J. J., Nisbet D. J. "Characterization of Chloramphenicol Resistance in Beta-Hemolytic *Escherichia coli* Associated With Diarrhea in Neonatal Swine" *Journal of Clinical Microbiology* Feb. 2002: 389-394.
4. Blanco J., Blanco M. (1993) "Escherichia coli enterotoxigenicos, necrotoxicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico microbiológico". Servicio publicaciones diputación provincial, Lugo, 1993.
5. Costa M. M., Drescher G., Maboni F., Weber S. S., Schrank A., Vainstein M. H., Schrank I. S., Vargas A. C. (2010) "Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms" *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.1, p. 30-36 .
6. European Food Safety Authority (EFSA) (2011) "Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC0104". [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/166e.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/166e.pdf)
7. Ewing W. H., Edwards and Ewing's (1986) "Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. The genus *Escherichia*". Elsevier, New York; 1986: 93-134.
8. Francis D. H., (2002) "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis" *Journal of Swine Health and Production*; 10(4):171-175.
9. Franke S., Gunzer F., Wieler L. H., Baljer G., Karch H. (1995). "Construction of recombinant Shiga-like toxin-liv (SLT-liv) and its use in monitoring the SLTIIv antibody status in pigs". *Vet Microbiol.*, 43: 41-52.
10. Kai Frydendahl (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.
11. Lin Z., Kurazono H., Yamasaki S., Takeda Y. (1993). "Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction". *Microbiol. Immunol.*, 37(7): 543-548.
12. Moredo F. A., Pineyro P. E., Marquez G. C., Sanz M., Colello R., Etcheverria A., Padola N. L., Quiroga M. A., Perfumo C. J., Galli L., Leotta G. A. (2015) "Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic characterization and Antimicrobial Resistance Profile" *Foodborne Pathogens and Disease*; 12 (8):704-711.
13. Nguyen Ut V., Coddens A., Melkebeek V., Devriendt B., Goetsouwiers T., Van Poucke M., Peelman L., Cox E. (2015) "High susceptibility prevalence for F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Flemish pigs" *Veterinary Microbiology* in press, corrected proof (note to users) available online 21/01/2016.

14. Ørskov F., Ørskov I. (1984) "Serotyping of *Escherichia coli*". In : Bergan, T. (eds.) *Methods in microbiology* 14: 43-112. Academic Press, London 1984.
15. Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P. A., Ponti W. (2005) "Microbiologia e immunologia veterinaria" seconda edizione: 164, 220-221.
16. Rajkhowa S., Sarma D. K. (2014) "Prevalence and antimicrobial resistance of porcine O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from India" *Trop Anim Health Prod* 46:931-937.
17. Rajkumari M., Tapan K. D., Santhalembi C., Parimal R., Indranil S., Sidhartha N. J., Abigail R.P., Rajesh C. (2015) "ESBL-producing Shiga-toxigenic *E. coli* (STEC) associated with piglet diarrhoea in India" *Trop Anim Health Prod* 47: 377-381.
18. Rüssmann H., Kothe E., Schmidt S., Franke D., Harmsen A., Caprioli A., Karch H. (1995). "Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome". *J. Med. Microbiol.*, 42:404-410.
19. Smith M. G., Jordan D., Chapman T. A., Chin J. J.-C., Barton M. D., Do T.N., Fahy V. A., Fairbrother J. M., Trott D. J. (2010) "Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistance enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea" *Veterinary Microbiology* 145 (3-4): 299-307.
20. Sojka W. J. (1965) "*Escherichia coli* in domestic animals and poultry". Review series no. 7 of the Commonwealth Bureau of Animal Health. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks: 184-214.
21. Xiang Chen, Song Gao, Xinan Jiao, Xiu Fan Liu (2004) "Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoeas in eastern China" *Veterinary Microbiology* 103: 13-20.



# RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN CEPPI DI STREPTOCOCCUS SUIIS ISOLATI NEL SUINO NEL PERIODO 2004-2014

LUPPI A.<sup>[1]</sup>, BONILAURI P.<sup>[1]</sup>, MAIOLI G.<sup>[1]</sup>, GHERPELLI Y.<sup>[1]</sup>, DOTTORI M.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) ~ Reggio Emilia ~ Italy*

Keywords: Streptococcus suis, antibiotic-resistance, swine

## Riassunto

Trecento-ventiquattro ceppi di Streptococcus suis isolati da casi di streptococcosi nel suino in Italia, nel periodo 2004-2014, sono stati sottoposti alla valutazione della sensibilità a diversi antibiotici impiegando il metodo della disco diffusione (Kirby-Bauer). I ceppi sono stati analizzati per la loro suscettibilità a 8 antimicrobici: lincomicin (2 µg), tilosina (30 µg), ampicillina (10 µg), penicillina (6 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg), cefalexina (30 µg) e ceftiofur (30 µg). La maggior parte degli isolati erano sensibili alla ampicillina, penicillina, amoxicillina + acido clavulanico, cefalexina e ceftiofur, mentre bassi livelli di sensibilità sono stati registrati per lincomicina, tilosina e tetraciclina. Il tasso di suscettibilità dei ceppi S.suis al trimetoprim-sulfametossazolo ha mostrato un certo grado di variabilità a seconda dell'anno di isolamento. Le tendenze relative alla suscettibilità dei ceppi di S.suis isolati nel periodo 2004-2014 ai singoli antimicrobici, non hanno mostrato alcuna variazione statisticamente significativa nel periodo in esame.

## Abstract

The antimicrobial susceptibility of 324 Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in Italy in the period 2004-2014 was determined by disc diffusion method (Kirby-Bauer). The strains were analysed for their susceptibility to 8 antimicrobials: lincomycin (2 µg), tylosin (30 µg), ampicillin (10 µg), penicillin (6 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1,25/23,75 µg), cephalexin (30 µg) and ceftiofur (30 µg). Most of the S.suis isolates were susceptible to ampicillin, penicillin, amoxicillin+clavulanic acid, cephalexin and ceftiofur, while very low levels of sensitivity were recorded for lincomycin, tylosin and tetracycline. The rate of susceptibility of S.suis strains to trimethoprim-sulphamethoxazole showed a certain degree of variability according to the year of isolation. The trends in susceptibility of S.suis strains isolated from 2004 to 2014 to individual antimicrobials did not show any statistically significant variation over the period considered.

## INTRODUZIONE:

Streptococcus suis è uno dei principali patogeni del suino ed è responsabile di diverse forme patologiche che includono quadri di meningite, di artrite, di pericardite, di polisierosite e di polmonite, correlate o meno a setticemia. Attualmente la streptococcosi rappresenta una delle problematiche sanitarie prevalenti e di maggior interesse nell'allevamento suino, per le quali ci si rivolge frequentemente al laboratorio diagnostico per l'isolamento del patogeno e per la successiva determinazione in vitro della sensibilità agli antibiotici. La patologia da S.suis è generalmente osservata nel periodo circostante lo svezzamento o inizio magronaggio, mentre in animali all'ingrasso si possono incontrare forme di endocardite ulcerosa-poliposa, che per la particolare conformazione macroscopica vengono anche definite a "cavolfiore". La malattia ha diffusione mondiale e causa importanti perdite economiche

nell'allevamento suino. La classificazione in sierotipi di *S.suis*, basata sulla identificazione degli antigeni capsulari, ha evidenziato una diversa distribuzione di questi tra i diversi paesi. In numerosi paesi Europei il sierotipo 2 è risultato quello isolato con maggiore frequenza, con alcune eccezioni come osservato per il sierotipo 9 risultato, dagli inizi del 2000, il più frequente in casi di streptococcosi in Germania, Olanda, Belgio e Spagna (6,7). Attualmente gli strumenti per il controllo della problematica sono l'impiego di vaccini stabulogeni e l'utilizzo della terapia antibiotica. Alcuni dei comuni antibiotici utilizzati nel trattamento e "prevenzione" della streptococcosi hanno evidenziato una minore attività a causa di un incremento dei fenomeni di antibiotico-resistenza tra i ceppi di *S.suis* (1,3). Il profilo di resistenza agli antibiotici è stato precedentemente descritto in ceppi di *S.suis* isolati da suini con forme respiratorie (6), tuttavia scarseggiano dati relativi alla sensibilità agli antibiotici di ceppi isolati da casi di streptococcosi. Nel presente lavoro si riportano i dati di antibiotico-resistenza di 324 ceppi di *S.suis* isolati nel periodo 2004-2014 da casi di streptococcosi nel suino.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Ceppi batterici**

Nel presente studio sono stati inclusi 324 ceppi di *Streptococcus suis* provenienti dall'attività diagnostica di routine della sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo 2004-2014. I ceppi batterici sono stati ottenuti dalla semina di materiale patologico prelevato da suini con streptococcosi (meningite, artrite, pericardite, polisierosite e setticemia) ed appartenenti ad allevamenti ubicati nel Nord Italia. Per ogni anno di isolamento non più di due ceppi sono stati inclusi nello studio se provenienti dallo stesso allevamento. L'isolamento di *S.suis* è stato eseguito su terreno colturale agar sangue con incubazione in termostato a 37°C. La crescita di colonie per morfologia riferibili al genere *Streptococcus* sono state identificate tramite metodi biochimici e sierologici standardizzati.

### **Sensibilità agli antibiotici**

I ceppi di *S.suis* isolati sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 8 antibiotici: lincomicina (2 µg), tilosina (30 µg), ampicillina (10 µg), amoxicillina+acido clavulanico (20 µg/10 µg), tetraciclina (30 µg), trimetoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg), cefalexina (30 µg) e ceftiofur (30 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 (2,4,5) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute (2,4,5). 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. I controlli di qualità dei test di suscettibilità sono stati eseguiti utilizzando due ceppi ATCC: *E.coli* ATCC 25922 e *S.aureus* ATCC 25923.

### **Analisi statistica**

Il tasso di sensibilità nei confronti di ciascun antibatterico è stato calcolato per ogni anno eseguendo il rapporto tra il numero di ceppi di *S.suis* sensibili e il numero totale di ceppi testati nei confronti di un determinato antibiotico. Attraverso l'impiego di un test chi-quadrato per trend lineare (regressione lineare utilizzando minimi quadrati ponderati), software Intercooled stata 7, è stato valutato l'eventuale trend in aumento o in diminuzione della sensibilità di ogni antibiotico nel periodo considerato. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con  $P < 0.05$ .

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati ed il relativo trend dei ceppi di *S.suis* isolati tra il 2004 ed il 2014 nei confronti di ogni antimicrobico impiegato sono riportati in tabella 1. I ceppi di *S.suis* testati hanno evidenziato diversi livelli di sensibilità a seconda delle molecole testate. In termini generali è possibile affermare che esistono due categorie di antibiotici che mostrano differenti livelli di attività nei confronti di *S.suis*. Nel primo gruppo si collocano ampicillina, penicillina, amoxicillina+acido clavulanico, ceftiofur, cefalexina, e trimetoprim+sulfametossazolo con livelli di sensibilità medio-alti. Tra queste molecole, l'amoxicillina+acido clavulanico e il ceftiofur sono quelle caratterizzate da maggiore efficacia, con percentuali di sensibilità, tra i ceppi testati nel periodo considerato, frequentemente del 100%. Nel secondo gruppo, invece, molecole come la tilosina, la lincomicina e la tetraciclina sono accomunate da scarsa attività nei confronti del patogeno.

Per quanto riguarda la valutazione di un possibile trend di diminuzione o aumento della sensibilità di *S.suis* nei confronti delle molecole testate, non è stata registrata nessuna variazione statisticamente significativa nel periodo considerato (2004-2014) (tabella 1).

Nel presente lavoro è riportata la sensibilità ad un pannello di antimicrobici di ceppi di *S.suis* isolati da casi di streptococcosi del suino. Come atteso i ceppi testati hanno mostrato elevata sensibilità all'ampicillina, che essendo molecola prototipo per l'amoxicillina in vitro, dev'essere presa come riferimento anche per quest'ultima. Questo dato, unitamente all'elevata attività anche della penicillina, riscontrata nel presente lavoro, conferma l'efficacia dei  $\beta$ -lattamici nel controllo e trattamento della streptococcosi nel suino attraverso medicazioni strategiche e interventi terapeutici in caso di comparsa della problematica. A questo proposito l'associazione amoxicillina + acido clavulanico, la cefalexina e il ceftiofur (considerata molecola prototipo per le cefalosporine a spettro esteso) hanno mostrato nel corso degli anni una costante elevata attività nei confronti del patogeno. I dati sopracitati sono in linea con quanto riportato da Wisselink et al. In uno studio condotto su 384 ceppi di *S.suis* isolati tra la metà e la fine degli anni '90 in 7 paesi Europei (Belgio, UK, Francia, Italia, Germania, Spagna e Olanda). In questo studio tutti i ceppi testati sono risultati sensibili a ceftiofur, cefquinome, enrofloxacin, florfenicolo e penicillina. Appare interessante sottolineare che fra questi agenti antimicrobici ceftiofur, cefquinome e penicillina hanno evidenziato valori di MIC<sub>90</sub> al di sotto o corrispondente alla concentrazione più bassa di antibiotico testata (6). Questi risultati sono in accordo con numerosi altri studi che riportano percentuali di sensibilità molto elevate o assenza di resistenze tra ceppi di *S.suis* nei confronti di penicillina, amoxicillina, ceftiofur, florfenicolo e gentamicina (3). Trimetoprim + sulfametossazolo ha evidenziato livelli di sensibilità medio-alti con una certa variabilità tra gli anni considerati, senza tuttavia mostrare un trend in aumento o diminuzione nel periodo considerato. Ritornando ai risultati dello studio di Wisselink et al., si sottolinea come tra i ceppi di *S.suis* inclusi nello studio il 6% abbia evidenziato resistenze nei confronti di trimetoprim + sulfametossazolo.

Dalla valutazione dei dati riportati in tabella 1 si rilevano elevati livelli di resistenza nei confronti di tetraciclina, tilosina e lincomicina. I risultati ottenuti sono in accordo con quanto riportato in letteratura, dove scarsa attività nei confronti di *S.suis* si riscontrano per tetraciclina e tilmicosina, con percentuali di ceppi resistenti rispettivamente del 75,1% e 55,3% (6). Non sorprende pertanto che il pattern di multiresistenza osservato con maggiore frequenza nei ceppi di *S.suis* sia caratterizzato dalla contemporanea resistenza nei confronti di tetracicline, sulfonamidi, macrolidi e lincosamidi (7).

I livelli di resistenza osservati nel presente studio nei confronti di tetraciclina e trimetoprim + sulfametossazolo, se comparati con i risultati riportati da Wisselink et al., appaiono

significativamente più elevati. Occorre, a questo proposito, considerare che gli isolati di *S.suis* utilizzati nello studio sopraccitato risalgono agli anni '90 e quindi i dati di MIC riportati non necessariamente riflettono l'attuale suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *S.suis* attualmente circolanti nel suino. Resistenze nei confronti di macrolidi/lincosamidi e tetracicline sono state frequentemente descritte in letteratura per ceppi di *S.suis*. Marie et al., riportano tassi di sensibilità del 20% per doxicilina e 30% per tilosina e lincomicina (3). Risultati simili sono stati ottenuti sempre in Francia da Morvan et al., dove in uno studio condotto su 400 ceppi isolati da casi di streptococcosi, il 38% risultava sensibile alla lincomicina e solo il 18% alla tetraciclina (3). In uno studio Spagnolo più dell'87% dei ceppi di *S. suis* isolati erano resistenti a tetracicline, sulfonamidi, macrolidi (7). A questo proposito appare interessante sottolineare come le resistenze osservate nei confronti di tetraciclina, lincomicina e tilosina sono state precedentemente descritte in Danimarca e Svezia, sia su ceppi datati, isolati tra il 1967 e il 1981 sia in ceppi più recenti, isolati tra il 1992 e 1997 (1). L'emergenza legata a queste resistenze sarebbe quindi piuttosto datata ed è da considerarsi come il probabile risultato dell'utilizzo intensivo di macrolidi e tetracicline nel tempo. A questo proposito, quindi, non sorprende il dato ottenuto nel presente lavoro e descritto in tabella 1, dove si rilevano per queste molecole (tetraciclina, lincomicina e tilosina) costantemente elevati livelli di resistenza, che con ogni probabilità sono emersi e si sono consolidati molti anni prima rispetto al periodo considerato nel presente lavoro. Andando a valutare il trend relativo alla suscettibilità dei ceppi di *S.suis* isolati nel periodo 2004-2014 ai singoli antimicrobici, non sono state evidenziate variazioni statisticamente significative, nel periodo di esame, per gli antibiotici considerati. I risultati del presente lavoro confermano le osservazioni di altri Autori (1,3,6,7) che riportano l'insorgenza di fenomeni di resistenza in ceppi di *S.suis*, descrivendo tuttavia una condizione relativamente stabile ed in particolare caratterizzata dall'assenza di variazioni significative della resistenza agli antibiotici di ceppi isolati nel periodo compreso tra il 2004 ed il 2014.

| ANTIBIOTICI                           | ANNI |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | STATISTICA |                |      |
|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------------|----------------|------|
|                                       | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 | r          | R <sup>2</sup> | p    |
| <b>Amoxicillina + Ac.Clavulanico</b>  | 100% | 100% | 100% | 100% | 96%  | 100% | 97%  | 96%  | 100% | 100% | 95%  | -0,06      | 0,0041         | n.s. |
| <b>Penicillina</b>                    | 75%  | 71%  | 68%  | 85%  | 68%  | 89%  | 70%  | 69%  | 73%  | 92%  | 82%  | -0,022     | 0,0005         | n.s. |
| <b>Ampicillina</b>                    | 82%  | 78%  | 84%  | 90%  | 76%  | 95%  | 81%  | 90%  | 90%  | 92%  | 86%  | 0,039      | 0,0015         | n.s. |
| <b>Cefalexina</b>                     | 100% | 94%  | 92%  | 97%  | 84%  | 89%  | 86%  | 100% | 95%  | 92%  | 86%  | -0,099     | 0,0099         | n.s. |
| <b>Ceftiofur</b>                      | 100% | 98%  | 97%  | 100% | 88%  | 100% | 95%  | 100% | 98%  | 100% | 92%  | 0,0029     | 0,0000         | n.s. |
| <b>Lincomicina</b>                    | 21%  | 0%   | 6%   | 3%   | 8%   | 21%  | 11%  | 10%  | 5%   | 8%   | 3%   | -0,029     | 0,0008         | n.s. |
| <b>Tetraciclina</b>                   | 6%   | 0%   | 8%   | 3%   | 0%   | 11%  | 0%   | 7%   | 2%   | 4%   | 5%   | -0,002     | 0,0000         | n.s. |
| <b>Tilosina</b>                       | 7%   | 6%   | 19%  | 13%  | 4%   | 16%  | 8%   | 10%  | 5%   | 8%   | 8%   | -0,062     | 0,0038         | n.s. |
| <b>Trimetoprim + Sulfametossazolo</b> | 65%  | 76%  | 51%  | 64%  | 83%  | 58%  | 54%  | 48%  | 66%  | 71%  | 65%  | -0,068     | 0,0046         | n.s. |

Tabella 1: Percentuale di ceppi di *S.suis* risultati sensibili ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2004-2014

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Aarestrup F.M., Rasmussen S.R., Artursson K., Jensen N.E. (1998). Trends in the resistance to antimicrobial agents of *Streptococcus suis* isolates from Denmark and Sweden. *Vet. Microbiol.* 63, 71-80.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (2008): Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals, Approved standard, 3rd edn. CLSI document M31-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania.
3. Marie J., Morvan H., Bertthelot-Herault F., Sanders P., Kempf I., Gautier-Bouchardon A.V., Jouy E., Kobish M. (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus suis* isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996-2000. *J. Antimicrob. Chemother.* 50, 201-209.
4. NCCLS (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – English Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
5. NCCLS (2004) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
6. Wisselink H.J., Veldman K.T., Van den Eede C., Salmon S.A., Mevius D.J. (2006). Quantitative susceptibility of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobials agents licensed in veterinary medicine. *Vet. Microbiol.*, 113, 73-82.
7. Vela A.I., Moreno M.A., Cebolla J.A., González S., Latre M.V., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J.F. (2005). Antimicrobial susceptibility of clinical strains of *Streptococcus suis* isolated from pigs in Spain. *Vet. Microbiol.*, 105(2):143-7.



# DESCRIZIONE CLINICA DI UN FOCOLAIO DI AFTA EPIZOOTICA IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO CLINICAL DESCRIPTION OF AN OUBREAK OF FOOT & MOUTH DISEASE IN A CLOSE-CYCLE UNIT

POZZI P.<sup>[1]</sup>, ETINGER M.<sup>[1]</sup>, GELMAN B.<sup>[1]</sup>, PIROGOV V.<sup>[1]</sup>, KHINICH E.<sup>[1]</sup>, HADANI Y.<sup>[1]</sup>

*<sup>[1]</sup>The Veterinary Services and Kimron Veterinary Institute, Ministry of Agriculture ~ Beit Dagan ~ Israel*

Keywords: Foot and Mouth, Vesicles, Swine

## **Riassunto**

Nel Novembre 2015, nelle sale parto di in un allevamento a ciclo chiuso di 350 riproduttori, si e' verificato un focolaio di Afta Epizootica, indotto dal Tipo O. Il focolaio ha comportando mortalita' nel 59% dei suinetti presenti e di una scrofa. Nelle scrofe si sono registrati altri due casi di mortalita', due eutanasi e nove invii alla macellazione d'urgenza, per un totale del 4% di perdite attribuibili al focolaio. I danni diretti in svezzamento, magronaggio/ingrasso sono stati trascurabili quanto a mortalita' (2,5% complessivamente), ma provocati dall'allungamento dei tempi di permanenza di circa 40 giorni, cio' dovuto al blocco della movimentazione degli animali. Il focolaio di Afta e' stato verosimilmente provocato dal passaggio incontrollato di piccoli ruminanti infetti provenienti dai Territori Palestinesi, nei quali lo stesso Tipo O era stato individuato circa 10 giorni prima.

## **Abstract**

In November 2015, a Foot and Mouth Disease (FMD) outbreak occurred in the farrowing unit of a farrow to finish unit of 350 breeders, induced by FMD virus Type O. The outbreak caused mortality of 59% of piglets and of one sow. Sows totalized two death; two euthanized and nine sent to slaughterhouse for urgent slaughtering, total 4% losses, as a consequence of the disease. Direct losses after weaning, growing/fattening units were negligible (2,5% in total) in terms of mortality, but mainly caused by a 40 days delay in slaughter, due to movements restrictions. The FMD outbreak was probably induced from uncontrolled passage of infected small ruminants coming from Palestinian Authority Territories, in which the same Type O was identified around 10 days before.

## **INTRODUZIONE:**

L'Afta Epizootica e' una malattia febbrile, acuta, altamente contagiosa, degli animali ungulati ad unghia fessa, domestici e selvatici; e' elencata nel Terrestrial Animal Health Code della Organizzazione Mondiale per la Sanita' Animale (OIE), cui i focolai sono riportati e per la quale la OIE stabilisce i criteri di zone indenni e/o zone sotto controllo vaccinale (1). La Malattia e' sostenuta da un virus della famiglia Picornavirus, genere Aphthovirus, del quale sono noti sette tipi immunologici (O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, ASIA1) (2,3) tra i quali non esiste protezione crociata (3) e parecchie decine di sottotipi, tra i quali possono esistere gradi variabili di protezione eterologa. L'animale ospita il virus gia' in replicazione, e lo puo' diffondere da 5 giorni prima della comparsa delle lesioni cliniche (ovini) e sino a 10 (suini). Il virus e' altamente resistente a temperature comprese tra sottozero (molti anni) e sino a 37-40 °C (diversi giorni); in ambiente asciutto ma anche in secrezioni (saliva, fluidi nasali, lacrimali, latte), escrezioni (feci, urine), organi, carcasse, produzioni animali (burro), nonche' aerosol (2,3). Queste caratteristiche rendono il virus di difficile

controllo in molte aree geografiche e facilitano la sua rapida diffusione. In ambiente acido a pH <6, o alcalino a pH >11, il virus e' rapidamente inattivato. Le lesioni cliniche nel suino comportano lesioni vescicolari al grugno, lingua, cercine coronario degli unghia e sino alla loro faccia ventrale, capezzoli della mammella. Alle lesioni si accompagnano febbre elevata, zoppia (con resistenza a volersi muovere per il dolore ai piedi). Entro 4-5 giorni le vescicole si rompono, con distacco totale dell'epitelio lesionato e ricopertura, in pochi giorni, da essudato fibrinoso (ad eccezione della lingua); le lesioni riparano in circa due settimane. A seconda delle condizioni di vicinanza tra animali, affollamento e condizioni micro-climatiche, il virus diffonde velocemente in allevamento; la mortalita' rimane moderata nei soggetti da ingrasso o adulti (1-3%); la febbre elevata (sino a 42°C)(3) e' probabilmente la causa di aborto nei riproduttori gravidi (3,4). I suinetti sottoscrofa (2) e sino a 8 settimane di vita (3,4) sono invece particolarmente colpiti; la mortalita' e' elevatissima (2) probabilmente attribuibile a febbre elevata ed a miocardite acuta; caratteristiche, ma non sempre macroscopicamente apprezzabili, le lesioni cardiache cosiddette a "cuore di tigre" (punteggiature o striature bianco-grigiastro attribuibili a tessuto necrotico). Questo lavoro descrive l'evoluzione clinica di un focolaio di Afta Epizootica in un allevamento a ciclo chiuso.

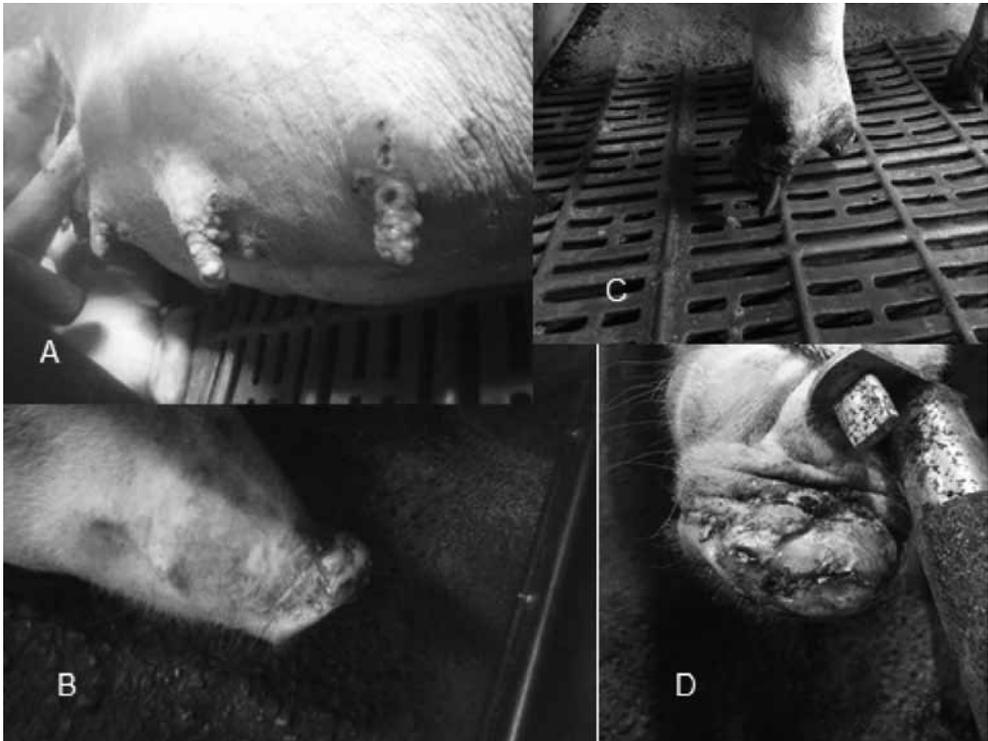


Figura 1:

Lesioni vescicolari in scrofe in sala parto. Vesicular lesions in sows in the farrowing unit.

A: mammella: vescicole recenti; evoluzione stimata: giorno 1-2.

B: grugno: vescicola recente; evoluzione stimata giorno 1-2.

C: unghia: vescicole aperte; evoluzione stimata: giorno 4-5.

D: grugno: vescicola con probabile essudato fibrinoso: evoluzione stimata: giorno 3-4.

## **MATERIALI E METODI:**

Azienda:

Il focolaio di Afta Epizootica si è sviluppato nelle sale parto di un'azienda di 300 scrofe e circa 50 scrofette, in inseminazione e gravide, di cui 66 riproduttori in lattazione e 12 pre-parto; circa 620 suinetti post svezzamento ed 820 soggetti in magronaggio/ingrasso; 6 verri. Le sale parto sono organizzate in stanze da 8 gabbie parto ciascuna, con stanze adiacenti ed aventi corridoi in comune. L'azienda è localizzata nella regione Nord di Israele, a circa 3,5 km dal confine con il Libano; è composta da diversi fabbricati, separati tra loro, fra l'altro, anche da una strada a transito locale. L'azienda, nel suo complesso, è caratterizzata da mancanza di misure preventive di bio-sicurezza: i diversi reparti, pur essendo recintati, presentano i cancelli quasi sempre aperti; la locale strada fa da transito a greggi di piccoli ruminanti ed anche bovini da carne a pascolo nelle zone circostanti. La zona circostante è popolata da cinghiali ed in passato l'azienda era già stata focolaio di Peste Suina Classica (PSC) probabilmente causata da contatto con suini selvatici (5) della zona, anch'essi risultati positivi al virus della PSC.

Evento clinico:

Il 19/11/2015, pomeriggio, i Servizi Veterinari ricevevano una segnalazione dal Veterinario aziendale relativamente ad aumento improvviso della mortalità dei suinetti in sala parto; elevate temperature (oltre 41°C); riluttanza delle scrofe ad alzarsi; morte di una scrofa; presenza di vescicole sul grugno di una scrofa (apparentemente non di quella morta); presenza di lesioni (non meglio definite) agli unghietti della scrofa morta. Non veniva segnalato nulla di particolare negli altri reparti: svezzamento, accrescimento, gestazione. Il 20/11/2015 in mattinata, seguiva la visita all'azienda ad opera dei Servizi Veterinari e del locale Distretto Veterinario. La visita cominciava dalla sala parto, origine della scrofa morta.

Parte delle scrofe in sala parto presentavano lesioni vescicolari a grugno, mammella, unghietti, verosimilmente in diverso grado di sviluppo (Figura 1)

Una scrofa in sala parto presentava un prolasso uterino in stato avanzato e verosimilmente irriducibile; si decideva di abbatterla per motivi di welfare e all'occasione utilizzarla per la raccolta di materiale biologico da inviare al laboratorio.

L'abbattimento dell'animale permetteva di evidenziare lesioni vescicolari in stadio avanzato, stimate al giorno 5-6 dall'insorgenza, al grugno ed alla lingua ed agli unghietti (Figura 2).

Sulla base dei segni clinici nelle scrofe, inclusa l'elevata mortalità sottoscrofa apparentemente asintomatica (esclusa la febbre), veniva emesso il sospetto di Afta Epizootica; l'allevamento veniva messo cautelativamente sotto sequestro; veniva stabilita una zona infetta del diametro di 3 km, con blocco della movimentazione di tutti gli animali sensibili, sino ad avvenuta conferma da parte del laboratorio.

Indagini di laboratorio:

All'occasione della visita in azienda venivano prelevati doppi campioni di sangue (con e senza anticoagulante EDTA) con vacutainer ed ago nuovo per ogni soggetto, da tre scrofe con sintomatologia clinica; effettuati tre tamponi da vescicole al grugno delle stesse scrofe; raccolti campioni di epitelio dalla lingua del soggetto abbattuto. Venivano inoltre inviati al laboratorio due suinetti interi e morti di recente, oltre ai cuori di 4 suinetti esaminati localmente. I campioni prelevati venivano sottoposti ad identificazione ed isolamento del (sospetto) virus aftoso:

- identificazione del virus aftoso tramite RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), verso tutti i Tipi.
- identificazione del Tipo O tramite PCR.
- identificazione del Tipo O tramite ELISA Antigene.
- identificazione del virus aftoso tramite ELISA-Anticorpo monoclonale.

- test differenziale – anticorpi potenzialmente da vaccinazione – ricerca anticorpi verso proteine non strutturali (NSP) del virus aftoso (4).

- isolamento in colture cellulari di rene di suino adulto per identificazione dell'effetto citopatico. Gli esami cui sopra, secondo le metodiche in uso presso il Kimron Veterinary Institute, Israele ed in linea con le procedure previste dalla OIE (6). I test eseguiti confermavano la presenza di virus aftoso del tipo O (classificato come: FMD/Fasuta/15). Il giorno 21/11/2015, in seguito alla conferma, alla zona infetta veniva aggiunta una zona di protezione del diametro di 10 km, con vincoli alla movimentazione di animali sensibili.

Solo il test NSP risultava negativo, cio' dovuto al fatto che il tempo di insorgenza di anticorpi verso le proteine non strutturali del virus aftoso e' di almeno 10 giorni.

Il tipo O isolato appartiene filogeneticamente al gruppo O/ME-SA/PanAsia e risulta correlato ai virus aftosi del sud-est asiatico (7).

Interventi in allevamento:

Alla luce delle lesioni riscontrate, considerando che Malattia Vescicolare (Picornaviridae; Enterovirus) e Stomatite Vescicolare (Rhabdoviridae; Vesiculovirus) non sono mai state segnalate nel Paese, si procedeva con la vaccinazione d'urgenza dell'allevamento. Veniva utilizzato un vaccino disponibile in inventario: trivalente, ad emulsione oleosa, contenente i Tipi O, A, Asia 1, gia' in uso nella popolazione bovina, al dosaggio di 2 ml, intramuscolo, con richiamo a distanza di 3-4 settimane. Veniva vaccinato l'intero effettivo: verri, scrofette e scrofe; suinetti pre-svezzamento; svezzati; magronaggio ed ingrasso. In considerazione del fatto che il focolaio si sviluppava, al momento, esclusivamente in sala parto, venivano date indicazioni per una netta suddivisione tra il personale addetto alla sala parto e quello addetto al resto dell'allevamento; istituiti punti di disinfezione all'ingresso di ogni reparto, nonche' dei veicoli che necessariamente avevano accesso all'azienda (trasporto mangime). Contemporaneamente, si realizzava una fossa da cremazione in azienda stessa per i soggetti morti, con divieto di trasporto al di fuori dell'azienda.

Evoluzione del focolaio

Sala parto:

Sin dal momento della visita in Azienda La situazione si presentava drammatica: nel giorno stesso, a partire dalla mattinata, venivano a morte 73 suinetti; il focolaio coinvolgera' complessivamente 66 nidiatae in 9 settimane (64 giorni) e la mortalita' sottoscrofa stimata come causata dal virus Aftoso superera' i 400 suinetti in meno di un mese (Grafico 1).

L'analisi giornaliera della mortalita' assoluta in sala parto, la cui lettura e' facilitata dal ridotto numero di parti giornalieri, permette di evidenziare il picco di mortalita' al giorno 20/11/2015. La valutazione dello stato di evoluzione delle lesioni piu' avanzate in alcune scrofe (Figura 2) permette di avanzare l'ipotesi di inizio di sviluppo del focolaio al giorno 12 o 13/11/2015.

Altri reparti:

In data 03/12/2015, durante un sopralluogo di controllo, mentre la situazione in sala parto risultava stabilizzata, si evidenziava sintomatologia clinica in uno dei due settori ingrasso: zoppie in circa il 10% dei soggetti; decubito; riduzione del consumo giornaliero di mangime; riluttanza ad alzarsi ed a muoversi. Malgrado le condizioni di scarsa pulizia, si riuscivano ad individuare lesioni al cercine coronario e, in modo meno chiaro, al grugno di qualche soggetto. Al 10/12/2015 non si osservavano piu' nuovi segni clinici ed i soggetti ripresentavano segni di attivita', appetito, sia pure con residui di zoppie. Nei settori svezzamento e magronaggio/ingrasso la mortalita' complessiva rimaneva comunque limitata, rispettivamente 33 soggetti su 621 (5,31%) e 3 soggetti su 820 (0,36%): difficile, se non impossibile, attribuire le cause all'episodio di Afta anziche' ad altro. Venivano successivamente evidenziate undici scrofe, precedentemente esposte in sala parto, con complicazioni a livello podale tali da comprometterne la guarigione: una veniva a morte; una abbattuta per ragioni di welfare; nove riformate ed inviate al macello. L'episodio di Afta veniva considerato risolto il giorno 25/12/2015: 42-43 giorni dall'inizio stimato; 35 giorni dopo l'inizio

del piano vaccinale; 15 giorni perlomeno dalla scomparsa di nuovi segni clinici. La prima spedizione di soggetti al macello avveniva il 31/12/2015.



Figura 2:

Lesioni agli unghielli, al grugno ed alla lingua; evoluzione stimata: giorno 5-6. Lesions at claws, snout and tongue; estimated evolution: day 5th – 6th.

### **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Il focolaio di Afta si e' sviluppato prevalentemente in sala parto, con scarso o nullo coinvolgimento degli altri settori dell'allevamento. A cio' possono aver contribuito l'immediato inizio della vaccinazione a tappeto dell'allevamento e le limitazioni di movimentazione del personale tra i diversi reparti. I danni economici attribuibili al settore magronaggio-ingrasso sono stati limitati quanto a mortalita' (2,5% complessivamente) e principalmente causati da un prolungamento del periodo di permanenza in allevamento di circa 40 giorni (+22%).

Israele e' soggetto a saltuari focolai di Afta Epizootica nei ruminanti. Per motivi di vicinanza tra allevamenti, e pratica del pascolo di ovi-caprini e bovini da carne, vengono svolte regolari campagne vaccinali che coinvolgono anche i riproduttori suini; non esiste una politica di stamping-out, come in altri Paesi. Similmente ai ruminanti, i riproduttori suini erano soliti ricevere una singola vaccinazione di richiamo annuale, a tappeto, in concomitanza con il periodo a rischio di focolai regionali: fine autunno – inizio inverno. L'allevamento in questione risultava vaccinato in data 11/2014. Il piano di profilassi vaccinale verso l'Afta, nel comparto suinicolo, ha evidenziato una carenza: o nella tempistica (stagionalita' della vaccinazione) o nella modalita' (vaccinazione a tappeto) o nella frequenza (singolo intervento vaccinale annuale) o nella categoria dei soggetti vaccinati (riproduttori solamente). Si decideva dunque, per il prossimo futuro, di modificare so-

stanzialmente il piano di profilassi vaccinale contro l'Afta nei suini, e di implementare il seguente: doppia vaccinazione di base nei giovani soggetti da destinare alla rimonta (scrofette e verretti); vaccinazione di richiamo semestrale nei verri; vaccinazione di richiamo nei riproduttori gravidi (scrofette e scrofe) circa 30 giorni prima del parto; utilizzazione del vaccino trivalente (A, O, Asia 1) come in passato. Questo schema vaccinale dovrebbe assicurare:

- una piu' uniforme copertura vaccinale dei soggetti vaccinati (tutti i riproduttori) (3) ed in sintonia con le caratteristiche dei vaccini anti-aftosi comunemente in uso.
- la protezione passiva colostrale dei suinetti, da riproduttori vaccinati, sino a circa 10-12 settimane d'eta'(3)
- una protezione verso i Tipi di virus Aftoso predominanti nella Regione.

In corso di focolaio, rimarrebbe a rischio la popolazione in accrescimento/ingrasso (12-26 settimane), peraltro con minori danni economici diretti stimabili (3,4), che andrebbe prontamente vaccinata con un vaccino monovalente in relazione al Tipo potenzialmente isolato.

Questa e' la prima descrizione clinica di un focolaio di Afta Epizootica in suini in Israele. Il focolaio si e' concentrato nelle sale-parto, causando ingenti danni a causa della elevate mortalita' sottoscrofa. I danni negli altri settori (svezzamento, magronaggio, ingrasso) sono stati limitati e prevalentemente causati da un ritardo nella macellazione a causa del sequestro dell'allevamento, dalla riforma di alcune scrofe (2,57%) oltre che dalla mortalita' o eutanasia di altre (1,43%).

#### Conclusioni

In data 12/11/2015, era stato segnalato ai Servizi Veterinari Israeliani un focolaio di mortalita' in un allevamento di 450 capre e 150 capretti nella zona di Shchem/Nablus (Territori Palestinesi), con sintomatologia riferibile ad Afta Epizootica; il 16/11/2015 dai campioni pervenuti al Kimron Institute era stato isolato ed identificato il Tipo O, successivamente isolato anche nell'episodio descritto nei suini il 19-20/11/2015.

In data 22/11/2015, in un allevamento di bovini da carne al pascolo, costituito da 43 vacche, 2 tori e 20 vitelli di diverse eta' (localizzato a circa 4,5 km dall'allevamento di suini descritto) venivano confermati due casi di Afta epizootica in due vitelli; il serotipo isolato ed identificato risultava essere lo stesso Tipo O gia' isolato in corso dei focolai nell'allevamento di suini e di capre.

Non e' stato possibile identificare la fonte di ingresso del virus Aftoso nell'allevamento di suini, ma la presenza di bestiame pascolato in zona e la concomitanza di un focolaio di Afta in un gregge di capre nei Territori Palestinesi, alimenta il sospetto di passaggio incontrollato di animali attraverso il confine tra Israele e Territori Palestinesi.

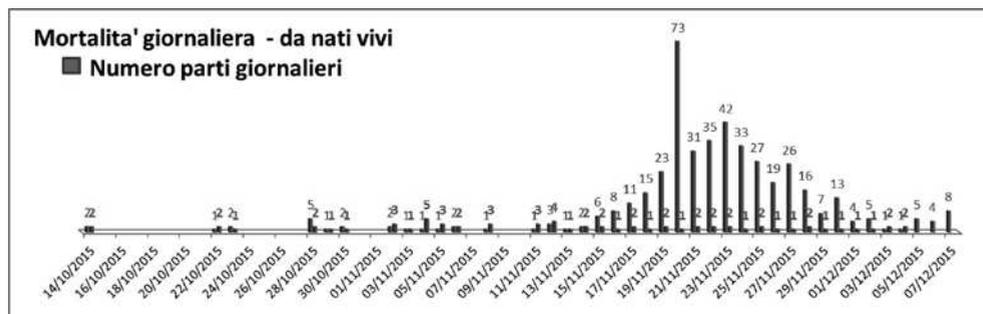


Grafico 1:

Evoluzione della mortalita' sottoscrofa prima e durante il focolaio.  
 Evolution of pre-weaning mortality before and along the outbreak.

**BIBLIOGRAFIA:**

1. OIE, Animal Disease Information, (2015) [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media\\_Center/docs/pdf/Disease\\_cards/Q\\_A-FMD-EN.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/Q_A-FMD-EN.pdf),
2. Farina G., (1998) "Picornavirus" in "Trattato di Malattie Infettive degli Animali", 2nda Ed. Farina R., Scatozza F. Editori, UTET, Torino, Italia, 839-888
3. Alexandersen S., Knowles N., Dekker A., Belsham G., Zhang Z., Koenen F., (2012) "Picornaviruses", in Diseases of Swine", 10ma Ed., Zimmerman J., Karriker L., Ramirez A., Schwartz K., Stevenson G. Editori; Wiley & Sons, Ames, Iowa, USA, 587-620
4. Cavirani S., (2013) "Malattie Vescicolari" in "Le Patologie del Maiale", 1a Ed. Point Veterinarie Italie Ed., Milano, Italia
5. David, D., Pozzi, P.S., Ozeri, R., Hadani, Y., Yadin, H., Schmeiser, S., Bashara, R., King, R. , Perl, S., (2012), "An Outbreak of Classical Swine Fever in Israel", *Isr. Jour. Vet. Med.*, 67 (4): 225-231
6. Foot and Mouth Disease (2012), in OIE – Terrestrial Manual 2.1.5; 145-173
7. WRLFMD (2012) Quarterly Report April-June, [http://www.wrlfmd.org/ref\\_labs/ref\\_lab\\_reports/OIE-FAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Report%20Apr-Jun%202012.pdf](http://www.wrlfmd.org/ref_labs/ref_lab_reports/OIE-FAO%20FMD%20Ref%20Lab%20Report%20Apr-Jun%202012.pdf)



# VALUTAZIONE DELLA CONCORDANZA TRA I RISULTATI OTTENUTI DALL'ANALISI DI FLUIDI ORALI E CAMPIONI DI SIERO NEL MONITORAGGIO DELLA PRRS IN SUINETTI SVEZZATI

VIO D.<sup>[1]</sup>, USTULIN M.<sup>[1]</sup>, TARGHETTA C.<sup>[1]</sup>, PIERASCO A.<sup>[1]</sup>, TOSON M.<sup>[2]</sup>,  
COCCHI M.<sup>[3]</sup>, TAGLIENTE D.<sup>[1]</sup>, PASSERA A.<sup>[3]</sup>, CONEDERA G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Cordenons (PN) ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Legnaro (PD) ~ Italy,

<sup>[3]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie ~ Basaldella di Campofornido (UD) ~ Italy

Keywords: Oral fluids, PRRS, weaned pigs, weaned pigs

## Riassunto

I fluidi orali sono, in Italia, una matrice ancora non ampiamente utilizzata, pur avendo ottime potenzialità sia per la ricerca di anticorpi che di agenti eziologici. Nel presente studio il confronto tra campioni di siero e di fluidi orali, prelevati da suini in fase di svezzamento e analizzati per PRRSV mediante PCR, ha dimostrato un'elevata concordanza tra i risultati ottenuti.

## Abstract

The use of oral fluids as a sample in swine diagnostic have already proved to be a reliable source of information for the detection of both antibodies and etiological agents. Still, oral fluids are not diffusely used in Italy yet. The aim of our study was to make a comparison between the use of serum and oral fluid as sample in weaned pigs of different ages. The results show a high agreement between the two materials for detection of PRRSV by PCR.

## INTRODUZIONE:

I fluidi orali hanno dimostrato di essere una matrice affidabile per la ricerca di anticorpi e di agenti patogeni nell'uomo (2) e in specie di interesse veterinario, incluso il suino (9).

La raccolta di fluidi orali permette di ottenere un campione rappresentativo degli animali presenti nel box sfruttando il naturale comportamento esplorativo dei suini, garantendo inoltre un minore stress per gli animali rispetto al prelievo di sangue (11).

Nonostante i dati bibliografici evidenzino che l'utilizzo dei fluidi orali sia uno strumento adeguato al monitoraggio di diverse patologie virali del suino (7), attualmente tale matrice non è diffusamente utilizzata a fini diagnostici: attualmente i veterinari che prelevano questo tipo di materiale e richiedono analisi su questa matrice sono pochi, così come i laboratori che utilizzano test o kit validati per l'uso su fluidi orali.

Lo scopo di questo studio è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dall'analisi per ricerca anticorpi e virus della PRRS in campioni di siero e fluidi orali, raccolti in suinetti svezzati di differenti età. I dati ottenuti hanno permesso di comparare i risultati analitici ottenuti dalla matrice fluidi orali con quelli ottenuti dal siero ematico, considerato matrice d'elezione nell'ambito delle analisi di screening della presenza di PRRSV in allevamento e della relativa diffusione intra-aziendale.

## MATERIALI E METODI:

Nel corso dello studio sono stati selezionati 10 allevamenti di suini da riproduzione. In ogni allevamento è stato selezionato un box per ogni età di animali in svezzamento da cui sono stati raccolti un campione di fluidi orali e 5 campioni di siero. Le età degli animali erano

comprese tra 30 e 90 giorni, con una modesta variabilità legata allo specifico management aziendale.

La raccolta dei fluidi orali è stata eseguita utilizzando corde di cotone come descritto in bibliografia (3; 6). In particolare, in ogni box è stata posizionata una corda in posizione tale da ridurre al minimo eventuali contatti con le superfici del box e in modo che l'altezza della corda ne garantisse l'accesso agli animali. La corda è stata lasciata a disposizione degli animali per circa 20 minuti. Al termine del tempo previsto, il fluido orale è stato raccolto sottoponendo la corda, posta in un sacchetto sterile, a torsione e compressione. Successivamente il liquido è stato trasferito in una provetta da 50 ml. I campioni sono stati mantenuti refrigerati fino alla consegna in laboratorio per garantire la stabilità del virus (8). Qualora non fosse possibile iniziare le analisi in giornata i campioni sono stati conservati a -80°C.

Contestualmente da ogni box sono stati selezionati casualmente 5 soggetti e sottoposti a prelievo ematico.

Ciascun campione di fluido orale è stato analizzato con metodica RT-PCR per la presenza di virus della PRRS (5) e per anticorpi anti PRRSV tramite il kit IDEXX PRRS OF Ab test (IDEXX Laboratories Inc.).

L'estrazione dell'RNA virale è stata eseguita sia per i fluidi orali che per i sieri con il Kit High Pure Viral RNA kit (ROCHE). Nel caso dei fluidi orali, prima dell'estrazione si è proceduto a centrifugare 400 µl di fluido a 15000g per 3 minuti e a raccogliere 200 µl del surnatante da sottoporre all'analisi.

I campioni di sangue sono stati testati per anticorpi tramite il kit IDEXX PRRS x3 Ab test (IDEXX Laboratories Inc.) singolarmente e in pool di 5, rispettando la suddivisione in box, e per PRRSV mediante PCR. Le analisi sierologiche sono state eseguite secondo le indicazioni della ditta produttrice dei kit.

I risultati ottenuti sono stati analizzati statisticamente per valutare la concordanza tra le due matrici.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Sono stati raccolti e inclusi nello studio un totale di 47 campioni di fluidi orali e 235 campioni di sangue dalle 10 aziende suinicole da riproduzione selezionate.

29/47 campioni di fluidi orale e 28/47 pool di 5 sieri sono risultati positivi in PCR per PRRSV. 42/47 campioni di fluidi orali e 105/235 campioni di siero sono risultati positivi per la presenza di anticorpi anti PRRSV e, considerando la distribuzione delle positività in base alla suddivisione in box degli animali testati, in 40/47 box è stato identificato almeno un animale positivo. La concordanza fra i risultati delle analisi in PCR nelle due matrici è stata valutata calcolando il test K di Cohen (K) per ogni fascia di età degli animali. Il valore calcolato è risultato significativamente diverso da zero per tutte le età, eccellente per i gruppi di 70 e 90 giorni di età (K=1), e buono per i gruppi di 30 e 50 giorni (K=0,77).

Il confronto tra le due matrici ha evidenziato una buona concordanza delle analisi in PCR, con un progressivo miglioramento della concordanza con l'aumento dell'età degli animali. I fluidi orali si confermano quindi una matrice adatta al monitoraggio della diffusione del virus della PRRS in allevamento (10).

Nel caso delle analisi sierologiche non è stato possibile calcolare il test K di Cohen per alcune fasce di età, in quanto non erano presenti campioni sia positivi che negativi per entrambe le matrici. Nello specifico tutti i campioni di fluido orale per animali di età pari o superiore a 90 giorni sono risultati positivi e, nelle stesse fasce di età, almeno un animale per box è risultato positivo alle analisi su siero. A 30 giorni tutti i campioni di fluido orale sono risultati positivi mentre da due box su 10 i campioni di siero sono risultati tutti negativi. La concordanza è risultata non significativamente diversa da zero a 50 giorni, ma moderata a 70 giorni di

età. Maggiori difficoltà si riscontrano dunque nel valutare la concordanza delle analisi sierologiche; non è stata infatti possibile la valutazione statistica in alcune fasce di età. Infatti in animali di età pari o superiore a 90 giorni tutti i campioni raccolti sono risultati positivi, presumibilmente a seguito della sieroconversione in un elevato numero di animali. Nel caso degli animali più giovani, ovvero di 30 giorni circa, tutti i campioni di fluidi orali hanno dato esito positivo. L'elevata diffusione di sieropositività è presumibilmente legata alla presenza di anticorpi dovuti all'immunità materna, normalmente ancora presenti a quest'età (12). Nei gruppi di età intermedie la concordanza non mostra valori elevati. Questi risultati, in apparente discordanza con dati bibliografici relativi ad animali stabulati individualmente (4), possono essere legati alla differente composizione di animali inclusi nei due campioni.

In conclusione si evidenziano i principali vantaggi pratici legati all'utilizzo dei fluidi orali come matrice di analisi. Poiché la raccolta di tale matrice non prevede manipolazioni degli animali, si dimostra più rispettosa del benessere animale e meno rischiosa per gli operatori rispetto al prelievo dei singoli campioni di sangue (1), permettendo in tempi ridotti e con minore laboriosità di ottenere un campione rappresentativo degli animali del box.

I risultati del presente studio, associati ai vantaggi elencati riguardo al prelievo dei fluidi orali, confermano l'utilità del prelievo di tale matrice per lo screening della PRRS in allevamento.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Decorte I., Van Breedam W., Van der Stede Y., Nauwynck H. J., De Regge N., Cay A. B. (2014) "Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs" *Veterinary Research* 2014, 10:134.
2. Hutse V., Van Hecke K., De Bruyn R., Samu O., Lernout T., Muyembe J.J., Brochier B. (2010) "Oral fluid for the serological and molecular diagnosis of measles". *International Journal of Infectious Diseases* 14 e991–e997
3. Kittawornrat A., Prickett J., Chittick W., Wang C., Engle M., Johnson J., Patnayak D., Schwartz T., Whitney D., Olsen C., Schwartz K., Zimmerman J.J. (2010) "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: Will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?" *Virus Research* 154 170–176.
4. Kittawornrat A., Engle M., Johnson J., Prickett J., Olsen C., Schwartz T., Whitney D., Schwartz K., Rice A., Ballagi A., Lizano S., Wang C., Zimmerman J.J. (2014) "Detection of PRRSV antibody in oral fluid specimens from individual boars using a commercial PRRSV serum antibody ELISA". *Proceedings of 22nd IPVS Congress, volume II* p. 997.
5. Persia, D., Pacciarini, M., Cordioli, P.S., 2001. Evaluation of three RT-PCR assays for the detection of porcine and respiratory syndrome virus (PRRSV) in diagnostic samples. In: *Proceedings of the 10th International Symposium of Veterinary Laboratory Diagnosticians and OIE Seminar on Biotechnology*, pp. 440–441.
6. Prickett J.R., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.-J., Evans R. B., Zimmerman J. J. (2008a). "Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions" *J VET Diagn Invest* 20: 156 DOI: 10.1177/104063870802000203.
7. Prickett, J.R., Kim, W., Simer, R., Yoon, K.J., Zimmerman, J. (2008b). Oral-fluid samples for surveillance of commercial growing pigs for porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2 infections. *Journal of Swine Health and Production* 16, 86–91.
8. Prickett, J., Cutler, S., Kinyon, J.M., Naberhaus, N., Stensland, W.R., Yoon, K.J., Zimmerman, J.J. (2010). Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and antibody in swine oral fluid. *J. Swine Health Prod.* 18, 187–195.

9. Prickett, J.R., Zimmerman, J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 5, 1–10.
10. Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon KJ, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Prev. Vet. Med.* 104:292–300.
11. White D.L., Rotolo M., Olsen C., Wang C., Prickett J.R., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher C., Hoogland M., Zimmerman J.J. (2014) “Pig behavior and the contribution of individual pigs to pen-based oral fluid samples. *Proceedings of 22nd IPVS Congress, volume II* p. 361.
12. Zimmerman J.J., Benfield D.A., Murtaugh M.P., Osorio F., Stevenson G.W., Torremorell M., (2006) “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (Porcine Arterivirus)” . In: *Diseases of swine 9th edition*, Blackwell Publishing (2006), 387-417.

## SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS “INFLUENZA D” IN SUINI DI ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA

FONI E.<sup>[1]</sup>, CHIAPPONI C.<sup>[1]</sup>, FACCINI S.<sup>[2]</sup>, BAIONI L.<sup>[1]</sup>, BARBIERI I.<sup>[3]</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>[2]</sup>,  
MERENDA M.<sup>[1]</sup>, ZANNI I.<sup>[1]</sup>, MANFREDI R.<sup>[1]</sup>, SANDRI G.<sup>[4]</sup>, NIGRELLI A.D.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna Sezione di Parma ~ Parma ~ Italy, <sup>[2]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna Sezione di Mantova ~ Mantova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy, <sup>[4]</sup>Agricola Tre Valli ~ Verona ~ Italy

Keywords: influenza D, virus, swine

### Riassunto

Tra i virus appartenenti alla famiglia Orthomyxoviridae è stato recentemente individuato un nuovo tipo di virus influenza che è stato proposto di identificare come “influenza D”. In questo studio è stata condotta una indagine virologica, nei confronti di virus “influenza D”, su campioni diagnostici (n.530) prelevati in suini di allevamenti (n.273) dell’area padana, in corso di forme morbose febbrili-respiratorie, ma anche nell’ambito di piani aziendali di monitoraggio sanitario. Tramite metodiche di tipo biomolecolare è stato possibile accertare la presenza di virus “influenza D” nel 3,2% dei campioni provenienti da 4 allevamenti (1,4%). E’ stato ottenuto isolamento virale da tre tamponi nasali tramite inoculazione di substrati cellulari (HRT-18 e ST). L’analisi genetica condotta su una selezione dei genomi ottenuti ha permesso di rilevare che i virus suini influenzali D italiani sono correlati fra loro e appartengono al cluster riferibile a D/swine/Oklahoma/1334/2011. Indagini epidemiologiche, virologiche e filogenetiche più accurate ed estese si rendono necessarie per delineare meglio il ruolo patogenetico di questo agente nel suino. Un approfondimento delle conoscenze è imperativo per ottenere elementi di valutazione sull’eventuale ruolo di serbatoio di questa specie nella epidemiologia dell’infezione e soprattutto per capire meglio la genesi e la storia evolutiva del virus “influenza D”.

### Abstract

Among the viruses belonging to the family Orthomyxoviridae a new type of influenza virus was recently identified. It has been proposed to be named “influenza D”. To evaluate circulation of “influenza D virus” in Italian pig farms a virological was conducted on diagnostic samples (n.530) collected from pig farms (n.273) in the Po Valley, during febrile-respiratory symptoms, but also on samples collected for health monitoring. By biomolecular tests (RT-PCR) it was possible to ascertain the presence of “influenza D” virus in 3.2% of samples from four monitored farms (1.4%). Virus isolation was obtained from three nasal swabs on cell lines (HRT-18 and ST). Genetic analysis conducted on a selection of available genomes revealed that the Italian swine influenza D viruses are closely related and cluster with D/swine/Oklahoma/1334/2011. Epidemiological investigations, virological and phylogenetic studies are required to better outline the pathogenic role of this virus in swine and to obtain elements of assessment on the possible role of swine as a reservoir of this virus and above all to better understand the genesis and the evolutionary history of this novel virus.

### INTRODUZIONE:

I virus influenza A, B and C (IAV, IBV, ICV) appartengono alla famiglia Orthomyxoviridae. IAV infetta uomo e varie specie di mammiferi e specie aviarie. Le specie aviarie selvatiche

rappresentano il serbatoio di persistenza del virus in natura. IBV è considerato agente di forme respiratorie stagionali nell'uomo con andamento simile alla infezione da IAV anche se con incidenza inferiore, mentre ICV viene riportato come agente di forme respiratorie lievi delle prime vie respiratorie nell'uomo (3, 10). Recentemente IBV è stato dimostrato essere in grado di infettare sia i suini (14) che i mammiferi acquatici (13). ICV è stato isolato solo una volta da suini in Cina nel 1981 e in quel caso era stata dimostrata una vicinanza genetica con ICV umano (4). Inoltre indagini sierologiche nei confronti di ICV umano condotte in Giappone e in U.K. hanno dimostrato una positività del 9,9% e 19% rispettivamente in suini di allevamento (1, 16). Nel 2011 in Oklahoma è stato isolato in suini affetti da sindrome simil-influenzale, un Orthomyxovirus, (C/swine/Oklahoma/1334/2011) (C/OK), le cui caratteristiche antigeniche e genetiche risultavano sovrapponibili a quelle di ICV (6). Indagini condotte successivamente hanno permesso di rilevare la circolazione di virus riferibili a C-OK in bovini in Francia, Cina e USA (2, 5, 7). Analisi genetiche approfondite hanno dimostrato che questi isolati non potevano essere considerati sovrapponibili a ICV umano. Di conseguenza si è valutata l'opportunità di inquadrare i virus "C-OK like" in un nuovo tipo di virus influenzale il cui prototipo D/swine/Oklahoma/1334/2011 è stato denominato in via provvisoria "virus influenza tipo D" (IDV) (6). In questo studio è stato inoltre riportata la realizzazione di una infezione sperimentale nel furetto, con dimostrazione di trasmissibilità da un soggetto all'altro. Il furetto è specie considerata assimilabile all'uomo per quanto riguarda la sensibilità alla infezione influenzale e per questo utilizzata come modello surrogato negli studi di patogenicità dei virus influenzale nell'uomo. In Canada, inoltre, una modesta indagine sierologica nell'uomo (316 sieri) ha dimostrato la presenza di anticorpi specifici per IDV con una incidenza dell'1,3% (6). Al fine di raccogliere elementi di valutazione sulla presenza e sulla eventuale circolazione di questo nuovo virus fra i suini dei nostri allevamenti, sono state avviate ricerche sia di tipo diretto su campioni diagnostici conferiti presso il laboratorio diagnostico che indagini indirette su campioni sierologici prelevati negli allevamenti interessati dalla infezione.

#### **MATERIALI E METODI:**

Nel periodo Giugno-Dicembre 2015 sono stati raccolti complessivamente 530 campioni diagnostici da 273 allevamenti suini dell'area Padana che venivano conferiti ai Laboratori delle Sezioni IZSLER di Mantova e Parma per accertamenti diagnostici nei confronti di affezioni respiratorie. I campioni erano rappresentati da tamponi nasali (n. 219), polmoni (n. 211) e fluidi orali (n.100).

In 4 aziende con riscontro di positività tramite test biomolecolari sono stati eseguiti prelievi di sieri in soggetti (n.90) appartenenti allo stesso gruppo nel quale si era riscontrata positività virologica.

Le caratteristiche e le attività di prelievo espletate in questi allevamenti si possono così riassumere:

A: Allevamento da ingrasso situato in provincia di Mantova, nessun sintomo clinico. E' stato eseguito, in soggetti di 30kg di peso, prelievo fluidi orali per il monitoraggio della circolazione del virus PRRS.

B: Allevamento ciclo chiuso situato nella provincia di Cremona, in concomitanza con episodi di febbre e aborto in scrofette, è stato eseguito prelievo tamponi nasali.

C: Allevamento ciclo chiuso in provincia di Treviso. E' stato eseguito prelievo di tamponi nasali in soggetti in svezzamento affetti da sintomatologia respiratoria.

D: Allevamento da ingrasso situato in provincia di Reggio Emilia, mortalità in magroni con manifestazioni respiratorie acute. E' stato eseguito prelievo di polmoni e tamponi nasali.

I campioni clinici sono stati sottoposti a screening tramite RT-PCR per la ricerca del gene

PB1 di IDV, con Real-Time PCR, secondo il metodo descritto da Hause (6). I campioni positivi sono stati testati per isolamento virale su colture cellulari, HRT18 (human rectal tumor) e ST (swine testicular cell line). Dopo l'infezione del monostrato l'incubazione è stata prolungata, in assenza di sofferenza cellulare, fino a 5 giorni. Per ciascun campione sono stati eseguiti due passaggi seriali.

La conferma della replicazione virale è stata eseguita tramite test biomolecolare RT-PCR (6). Reazioni di amplificazione e sequenziamento genomico con sequenziatore Miseq (Illumina) sono state approntate sia su campioni clinici risultati positivi al test biomolecolare (n.2), che su una sospensione ottenuta nelle prove di isolamento virale su monostrati cellulari (5).

Le sequenze genetiche ottenute sono state allineate mediante il software ClustalW (9) con le sequenze di virus influenzali D presenti in GenBank. Gli alberi filogenetici sono stati elaborati con il metodo Maximum likelihood con il software IQTREE (11) e sono stati graficamente condensati mediante MEGA5 (15).

Tutti i campioni clinici testati per IDV e i campioni di sangue che corredavano i conferimenti sono stati sottoposti anche ad analisi batteriologiche e/o virologiche nei confronti dei più comuni patogeni del suino (virus influenza A, virus PRRS, PCV2, virus Malattia di Aujeszky) secondo i metodi di prova interni e/o normati in uso nella routine diagnostica dei laboratori IZSLER. I sieri sono stati trattati per l'eliminazione di fattori aspecifici inibenti l'emoagglutinazione secondo quanto previsto in (8) successivamente sono stati diluiti in base 2 da 1/20 a 1/160 ed esaminati tramite inibizione dell'emoagglutinazione (12) per l'evidenziazione di anticorpi nei confronti di IDV. I campioni con valore anticorpale  $\geq 1/20$  venivano considerati positivi.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

L'analisi eseguita tramite RT-PCR ha messo in evidenza la presenza del virus IDV in 17 campioni diagnostici (3.2%) provenienti da 4 (1,4%) diversi allevamenti delle province di Mantova, Treviso, Reggio Emilia e Cremona. Dei 17 campioni positivi, 14 erano rappresentati da tamponi nasali (6,3%), due erano fluidi orali mentre solo un campione di tessuto polmonare è stato riscontrato positivo (0,4%).

L'isolamento virale è stato ottenuto sulle linee cellulari HRT18 e ST da tre tamponi nasali provenienti da due allevamenti, uno in provincia di Mantova ed uno in provincia di Reggio Emilia. Gli isolati sono stati identificati come: D/swine/Italy/199724-3/2015, D/swine/Italy/354017-7/2015 e D/swine/Italy/354017-11/2015. L'analisi genetica condotta su virus isolato D/swine/Italy/199724-3/2015 e su due campioni di tampone nasale D/swine/Italy/254578/2015 e D/swine/Italy/268344/2015 ha evidenziato che i virus influenza D italiani sono strettamente correlati tra loro e raggruppano, insieme con gli isolati IDV finora ottenuti in bovini italiani, in un cluster riferibile a D/swine/Oklahoma/1334/2011 (Figura1). Per quanto riguarda esiti analitici riguardo ad altri agenti eziologici il quadro diagnostico completo si può così riassumere:

A: fluidi orali positivi per virus PRRS e negativi per influenza A e PCV2.

B: tamponi nasali negativi per virus PRRS e Influenza A ma accertamenti su altri campioni prelevati in breve successione hanno dimostrato circolazione di virus PRRS.

C: tamponi nasali positivi per virus PRRS, virus influenza A e PCV2d.

D: polmoni positivi per *Actinobacillus pleuropneumoniae*, negativi virus PRRS e virus influenza A.

Tamponi nasali negativi per PRRS e influenza A ma positivi per PVC2. Dei 90 sieri prelevati nei gruppi cui appartenevano i soggetti risultati positivi a PCR dal campione clinico, 26 (28%) sono risultati positivi per anticorpi inibenti emoagglutinazione nei confronti di IDV, di questi 15 (57%) con titolo 1/20, 6 (23%) con titolo 1/40 e 5 (19%) con titolo 1/80. Questo

studio preliminare ha permesso di verificare che attualmente negli allevamenti suini dell'area padana è rilevabile la circolazione di IDV sia tramite indagine virologica che sierologica. Questo agente virale ha mostrato un certo grado di difficoltà a replicare su substrati cellulari, infatti si sono ottenuti solo 4 stipiti isolati dai 17 campioni positivi alla prova biomolecolare. Probabilmente questa difficoltà è legata, più che a scarsa affinità ai substrati utilizzati, ad una vera e propria esiguità di particelle virali presenti nel campione, infatti, nei 4 casi di successo, l'isolamento è stato ottenuto in tutti i substrati utilizzati. Per quanto riguarda la matrice d'elezione per il rilevamento di IDV, visto le percentuali di positività riscontrate sia nelle prove biomolecolari che nelle prove di isolamento sembra che il tampone nasale sia materiale diagnostico più indicato per la rilevazione del virus. Questa osservazione ci permette anche di azzardare l'ipotesi che le prime vie respiratorie siano il sito di elezione per la replicazione virale.

Non è stato possibile, nei casi osservati, mettere in correlazione il rilevamento dell'agente IDV con problematiche cliniche di gruppo rilevate, infatti i campioni clinici sono risultati positivi contemporaneamente a più di uno degli agenti eziologici ricercati oltre IDV. Inoltre la positività biomolecolare è stata riscontrata, come nel caso dell'allevamento A, in suinetti in assenza di sintomatologia clinica.

La risposta sierologica degli animali appartenenti ai gruppi nei quali si è osservata positività virologica per IDV, se pur presente, va considerata di modesta entità; infatti solo il 28% dei campioni è risultato positivo e la maggior parte di questi (57%) a titolo 1/20. Ad oggi il numero di virus sequenziati e presenti in Genbank è ancora esiguo tuttavia l'analisi di tutti i segmenti genomici mostra che i virus finora isolati in Italia appartengono ad uno stesso cluster genetico e non sono stati evidenziati fenomeni di riassortimento.

Questi dati epidemiologici, se pur con la limitazione dei brevi tempi di raccolta dei campioni, forniscono comunque già indicazioni specifiche sulla presenza e incidenza della infezione da IDV nei nostri allevamenti. Si rendono comunque necessarie ulteriori indagini sia virologiche che sierologiche per delineare meglio l'eventuale ruolo patogenetico dell'agente virale nella specie suina e/o l'eventuale ruolo di serbatoio rappresentato da questa specie, ma anche per arricchire il "data base" delle sequenze genetiche di questi virus e poter quindi meglio capire la storia evolutiva di questo virus. Lo studio filogenetico approfondito e comparato con IDV isolato da altre specie, per il momento il bovino, tra le specie animali, sembra essere sensibile a questa infezione, permetterebbe anche di acquisire elementi di valutazione su eventuali risvolti zoonosici che, non si può escludere, possano palesarsi anche con i virus influenzali tipo D alla stregua di quanto ben noto, in merito, nell'ambito dei virus influenzali tipo A.

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Brown IH, Harris PA, Alexander DJ. Serological studies of influenza viruses in pigs in Great Britain 1991-2. *Epidemiol Infect.* 1995 Jun;114(3):511-20.
2. Ducatez MF, Pelletier C, Meyer G. Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. *Emerg Infect Dis.* 2015 Feb;21(2):368-71.
3. Gouarin S, Vabret A, Dina J, Petitjean J, Brouard J, Cuviron-Nimal D, et al. Study of influenza C virus infection in France. *J Med Virol.* 2008 Aug;80(8):1441-6.
4. Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM. Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. *J Gen Virol.* 1983 Jan;64 (Pt 1)(Pt 1):177-82.
5. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio.* 2014 Mar 4;5(2):e00031-14.

6. Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, et al. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. *PLoS Pathog.* 2013 Feb;9(2):e1003176.
7. Jiang WM, Wang SC, Peng C, Yu JM, Zhuang QY, Hou GY, et al. Identification of a potential novel type of influenza virus in Bovine in China. *Virus Genes.* 2014 Dec;49(3):493-6.
8. Kendall AP, Pereira MS, Skehel JJ. *Concepts and Procedures for Laboratory-Based Influenza Surveillance.* Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention: Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ, editors.; 1982.
9. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics.* 2007 Nov 1;23(21):2947-8.
10. Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, et al. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis.* 2006 May 1;193(9):1229-35.
11. Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol.* 2013 May;30(5):1188-95.
12. OIE. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Part 2, Section 2.8, Chapter 2.8.8.* 2015th ed. ; 2015.
13. Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA. Influenza B virus in seals. *Science.* 2000 May 12;288(5468):1051-3.
14. Ran Z, Shen H, Lang Y, Kolb EA, Turan N, Zhu L, et al. Domestic pigs are susceptible to infection with influenza B viruses. *J Virol.* 2015 May;89(9):4818-26.
15. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 2011 Oct;28(10):2731-9.
16. Yuanji G, Desselberger U. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. *J Gen Virol.* 1984 Nov;65(Pt 11):1857-72.



# CIRCOLAZIONE DI PCV2 IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD ITALIA: VERSO UN NUOVO SHIFT GENETICO?

BARBIERI I.<sup>[1]</sup>, FACCINI S.<sup>[2]</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>[1]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[3]</sup>,  
ROSIGNOLI C.<sup>[2]</sup>, FRANZINI G.<sup>[2]</sup>, NIGRELLI A.<sup>[2]</sup>

<sup>[1]</sup>IZSLER Reparto Genomica ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>IZSLER Sez. Mantova ~ Mantova ~ Italy, <sup>[3]</sup>IZSLER Sez. Brescia ~ Brescia ~ Italy

Keywords: PCV2, genotype, genetic shift

## Riassunto

Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un importante agente patogeno responsabile di diverse sindromi nei suini collettivamente denominate malattie da PCV (PCVD). Sulla base della sequenza di ORF2, i ceppi di PCV2 sono attualmente classificati in quattro genotipi: PCV2a, PCV2b, PCV2c e PCV2d. Quest'ultimo è considerato "emergente", essendo sempre più frequentemente isolato a livello mondiale, facendo ipotizzare un imminente shift genetico tra PCV2b e PCV2d. Lo studio riporta i risultati di una attività di monitoraggio di due anni sui ceppi di PCV2 circolanti in allevamenti suini prevalentemente del nord d'Italia. Sono stati effettuati 79 sequenziamenti di ORF2 di ceppi da casi sospetti di PCVD da 58 allevamenti. PCV2b è risultato il genotipo prevalente, circolando nel 63.8% degli allevamenti, seguito dal genotipo PCV2d (29.3%) e PCV2a (6.8%). Un importante incremento del PCV2d si è riscontrato nel corso del 2015. Nel 2014 su 30 allevamenti di provenienza dei ceppi sequenziati, nell'86.7% era presente PCV2b e in uno solo si è riscontrato PCV2d (3.33%). Nel 2015 invece, dei 28 allevamenti campionati il 37,9% aveva PCV2b e il 55,2% PCV2d. I dati rafforzano l'ipotesi di PCV2d come genotipo emergente e di uno shift genetico imminente o addirittura in corso tra PCV2b e PCV2d. In questo contesto sostenere i dati diagnostici con l'analisi di sequenza è estremamente importante.

## Abstract

Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) is an important pathogen related to several disease syndromes in pigs collectively named PCV diseases (PCVD). Based on ORF2 sequences, PCV2 strains are currently classified into four genotypes: PCV2a, PCV2b, PCV2c and PCV2d. The latter is considered an emergent genotype as it has been increasingly isolated worldwide. In this work we report a two-year monitoring activity on PCV2 in swine farms located in the North of Italy. Seventy-nine sequences have been obtained from cases of suspect PCVD. PCV2b is the most widespread genotype: it has been detected in 63.8% of farms, followed by PCV2d (29.3%) and PCV2a (6.8%). A considerable increase in PCV2d frequency was registered during 2015. Indeed in 2014 PCV2b was present in 86.7% of 30 herds and PCV2d circulated in only one (3.33%). On the contrary, in 2015 in 37,9% of the herds were infected by PCV2b, and 55,2% by PCV2d. Data strengthen the hypothesis of PCV2d as an emergent genotype and of an imminent or even ongoing genetic shift between PCV2b and PCV2d. In this context sustaining diagnostic data with sequence analysis is extremely important.

## INTRODUZIONE:

Porcine Circovirus type 2 (PCV2) appartiene alla famiglia Circoviridae, genere Circovirus. PCV2 è ampiamente diffuso nella popolazione suina mondiale. Le infezioni causate

da questo virus possono essere subcliniche o associate a differenti patologie collettivamente definite PCV diseases (PCVD) ovvero malattie da PCV (30). Tra le manifestazioni cliniche più comunemente associate all'infezione vi sono la malattia sistemica da PCV2 (PCV-SD, precedentemente denominata PMWS), disturbi respiratori, disordini riproduttivi, forme enteriche, sindrome dermatite nefrite (PDNS). Se l'infezione da PCV2 è un requisito per l'insorgere di PCVD altri co-fattori sono necessari per scatenare e indurre la forma clinica della malattia (5; 31). Tra le cause scatenanti note vi sono la presenza di agenti co-infettanti quali Parvovirus, PRRSV, Mycoplasma hyopneumoniae, l'immuno stimolazione (2; 20)(1; 25), particolari stress o cattive pratiche di allevamento (5; 31). E' comunque ampiamente dimostrato che i titoli virali di PCV2 presenti nei tessuti e nei sieri degli animali affetti dalla forma clinica della malattia sono correlati alla gravità della sintomatologia e alle lesioni istopatologiche tipiche, quali la deplezione linfocitaria e l'infiammazione granulomatosa (11; 23; 32; 34). Ne consegue che, se la PCR qualitativa non è di grande utilità ai fini diagnostici, la Real-Time PCR quantitativa (qPCR) può essere di grande supporto soprattutto nella diagnosi ante mortem. Purtroppo però la scarsa riproducibilità delle quantificazioni virali ottenute mediante qPCR in laboratori diversi (13; 16) e l'applicazione di metodiche differenti, rendono difficoltoso stabilire dei cut-off univoci da utilizzare per la diagnosi di PCVD (12; 14; 23; 32). La presenza di titoli virali molto elevati,  $>10^8$  copie genoma/g tessuto o  $>10^6$  copie genoma/mL siero o fluido orale, possono comunque essere considerati, una forte indicazione diagnostica di PCVD (34). Il genoma di PCV2 è costituito da una molecola di DNA circolare a singolo filamento di 1,766–1,768 nucleotidi (nt) in cui sono presenti 4 principali open reading frames (ORFs). Sulla base della variabilità genetica di ORF2, che codifica per la proteina capsidica virale, sono stati fino ad ora individuati 4 genotipi: PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d (3; 9; 33; 41), ma nuove varianti vengono continuamente segnalate (15). Il genotipo PCV2a era il più comune fino al 2003, in seguito a quello che viene definito uno shift genetico, è successivamente stato soppiantato dal genotipo PCV2b (22). PCV2c era stato individuato in campioni danesi raccolti tra il 1980 e il 1990 e solo recentemente è stato osservato nel Pantanal in Brasile (7). PCV2d è molto simile a PCV2b. La caratteristica distintiva fondamentale è la presenza di un residuo di Lisina (K) addizionale nella proteina nucleocapsidica in posizione 234. PCV2d è stato descritto per la prima volta in Cina (37). Successivamente ceppi molto simili sono stati isolati in tutto il mondo (4; 10; 17; 27-29; 38; 40) spesso in associazione a casi di sospetto fallimento vaccinale, suscitando l'interesse della comunità scientifica. La vaccinazione, infatti, è la migliore ed efficace strategia di controllo di PCVD, in grado di ridurre drasticamente la mortalità, la gravità della sintomatologia e incrementare l'accrescimento dei suinetti. Tutti i vaccini commerciali contro PCV2 sono basati sul genotipo PCV2a. Ciononostante, i dati clinici e gli studi sperimentali provano indiscutibilmente la loro efficacia nel controllo delle infezioni da PCV2b e PCV2d (24). Nessun tipo di vaccino però conferisce un'immunità completa. I suini vaccinati infatti possono ancora essere infettati dal virus (19), che quindi continua a circolare negli allevamenti sottoposti a vaccinazione. Di conseguenza non può essere escluso che l'immunità derivante dalla vaccinazione eserciti una pressione selettiva che possa portare all'emergere di ceppi di PCV2 in grado di evadere la vaccinazione (18; 21). In considerazione di quanto appena descritto, vi è un crescente interesse all'analisi della variabilità genetica dei ceppi di PCV2 circolanti nei vari territori (7; 17; 18; 26; 29; 35; 39; 41). Scopo del presente lavoro è quello di studiare da un punto di vista molecolare i ceppi di PCV2 rilevati in casi di sospetta PCVD caratterizzati da elevati titoli virali, considerati compatibili con la forma clinica della malattia secondo la maggior parte degli studi (30).

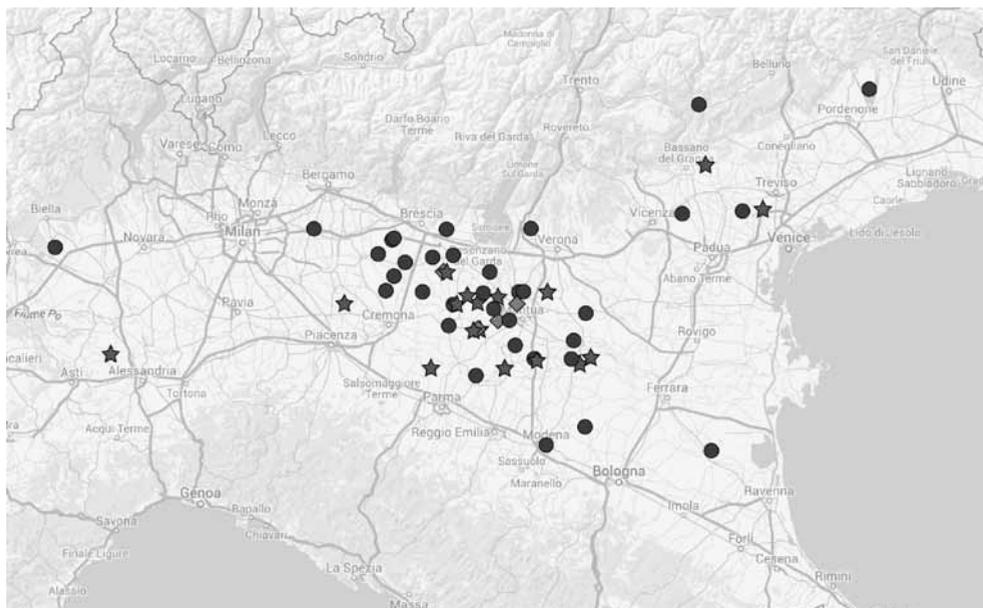
## **MATERIALI E METODI:**

Tra gennaio 2014 e dicembre 2015, al fine di studiare i ceppi di PCV2 legati a episodi di sospetto PCVD negli allevamenti del Nord d'Italia, si è proceduto al sequenziamento di campioni con titoli virali  $> 10e+ 8$  copie genoma/g tessuto o  $> 10e+ 6$  copie genoma/mL siero o fluido orale, conferiti presso le sezioni di Mantova e Brescia, per diagnosi di PCVD. Gli acidi nucleici sono stati estratti con il sistema semiautomatico King-Fisher Flex utilizzando il kit One-for-all Vet Kit (Qiagen, USA) secondo le indicazioni del produttore. Il genoma di PCV2 è stato rilevato e quantificato con Real-Time PCR secondo quanto precedentemente descritto (6; 23). Le sequenze di ORF2 sono state ottenute utilizzando BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v1.1, (Life Technologies) con 3500xl genetic analyzer (Life Technologies) secondo il protocollo descritto in precedenza (29). Per 37 ceppi sono state anche rilevate le sequenze del genoma totale (29). Le sequenze sono state assemblate e allineate con quelle di riferimento per ciascun genotipo noto (PCV2a: AF055392; PCV2b: AF055394; PCV2c: EU148503; PCV2d: JX535297; PCV2 variante Messico/USA 2015: KT795287) utilizzando i moduli SeqMan and MegAlign del software Lasergene (DNASStar Inc., Madison, WI, USA). L'analisi filogenetica è stata condotta mediante metodo Maximum likelihood con il modello Kimura two-parameter utilizzando il software MEGA 6 (36).

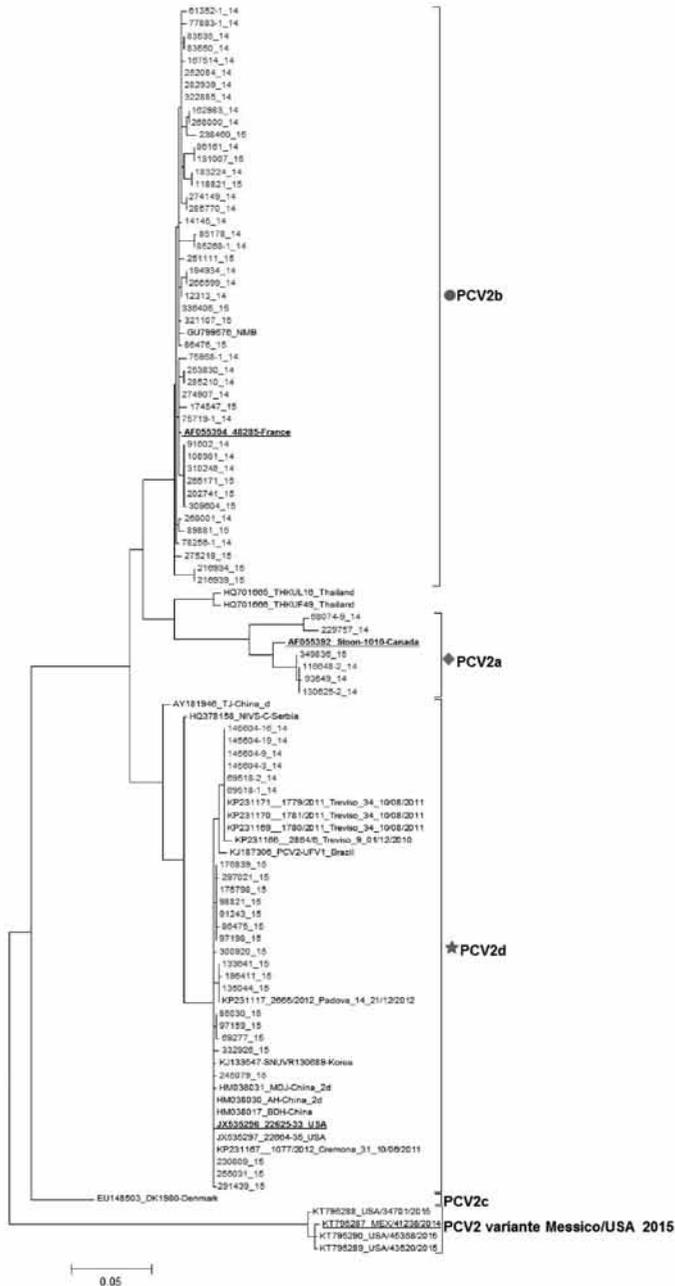
## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

Tra gennaio 2014 e dicembre 2015 sono stati sequenziati 79 campioni, di cui: 11 seri, 62 tessuti, 2 fluidi orali, 4 feti, tutti con titoli virali  $> 10e+ 8$  copie genoma/g tessuto o  $> 10e+ 6$  copie genoma/mL siero o fluido orale, conferiti presso le sezioni di Mantova e Brescia per diagnosi di sospetta PCVD. I campioni provenivano da 58 allevamenti dislocati prevalentemente nella Pianura Padana (figura 1). L'analisi di sequenza e filogenetica hanno dimostrato la presenza nel territorio di tre genotipi: PCV2a, PCV2b e PCV2d (figura 2). Il PCV2c invece non è mai stato individuato così come le più recenti varianti Messico/USA del 2015 (15). Dal punto di vista molecolare i ceppi di genotipo emergente PCV2d identificati mostrano un'identità nucleotidica del 99-100% e una identità amminoacidica del 100% con i ceppi di riferimento del genotipo d (JX535297) e presentano il residuo di Lisina extra in posizione 234 caratteristico. Considerando i dati globali, il genotipo PCV2a è stato rilevato in 6 campioni (7.5 %) da 4 allevamenti (6.8%). Il genotipo PCV2b è risultato invece il prevalente: 44 sequenziamenti, infatti presentavano questo genotipo (55.7%), per un totale di 37 aziende di provenienza (63.8%). PCV2d, infine, è stato riscontrato in 26 campioni (32.9%) da 17 allevamenti (29.3%). In una azienda è risultato circolare in un primo momento il genotipo PCV2b e successivamente, a distanza di una decina di mesi, PCV2d. In due aziende invece si è riscontrata la concomitante circolazione b/d. I dati globali sono coerenti con il quadro delineato da una recente indagine condotta su campioni archiviati tra il 2002 ed il 2014 provenienti dalla stessa area geografica, che ha evidenziato la predominanza del genotipo PCV2b e la concomitante circolazione di PCV2a e PCV2d (8). E' però interessante osservare la distribuzione nel tempo dei genotipi rilevati nel presente studio. Nel 2014, infatti, sono state ottenute 41 sequenze di ceppi da 30 allevamenti. Nel 10% di queste circolava il genotipo PCV2a, nell'86.7% il PCV2b e in una soltanto (3.33%) il PCV2d. Al contrario, nel 2015, 35 sequenze sono state ottenute da 29 allevamenti e PCV2b circolava nel 37,93%, mentre nel 55.17% era presente PCV2d e solo un'azienda aveva il genotipo PCV2a (figura 3). Nonostante la presenza del genotipo PCV2d in Italia sia stata datata già a partire dal 2011 (Franzo et al., 2015b) i dati del presente lavoro suggeriscono che nel 2015 questo genotipo abbia iniziato predominare nella popolazione suina, almeno nel Nord Italia,

rafforzando l'ipotesi dell'esistenza di uno shift genetico in corso (41). La reale portata di tale fenomeno è, tuttavia, difficile da stabilire a causa del numero limitato di sequenze recenti disponibili per il territorio italiano. I protocolli di diagnosi di PCV2, infatti, raramente prevedono il sistematico il sequenziamento del genoma totale, o almeno della ORF2 dei ceppi. In conclusione lo studio conferma la crescente diffusione di PCV2d negli allevamenti italiani, rafforzando l'ipotesi di uno shift genetico in atto, simile a quello verificatosi tra il genotipo a e b (22). Una stretta sorveglianza epidemiologica che preveda l'affiancamento del sequenziamento alla diagnostica classica è estremamente importante in questa fase, sia per chiarire il possibile ruolo di eventuali fattori selettivi implicati in questo fenomeno, che per monitorare costantemente l'eventuale insorgenza di nuove varianti.



Siti di provenienza dei ceppi sequenziati. Ogni cerchio corrisponde a una azienda con PCV2b circolante, ogni rombo con PCV2a e ogni stella con PCV2d.



Albero filogenetico delle sequenze di ORF2 di ceppi di PCV2 ottenute nel 2014 e 2015. L'analisi è stata condotta mediante metodo Maximum Likelihood con il modello Kimura two-parameter. Le sequenze dei ceppi prototipo per ciascun genotipo noto (Pcv2a, PCV2b, PCV2c e PCV2d) e della nuova variante Messico/USA 2015 sono sottolineate. Nell'albero sono inclusi anche ceppi di riferimento dei vari genotipi reperibili in GenBank tra cui 6 sequenze italiane appartenenti al genotipo PCV2d precedentemente descritte (Franzo et al. 2015b)

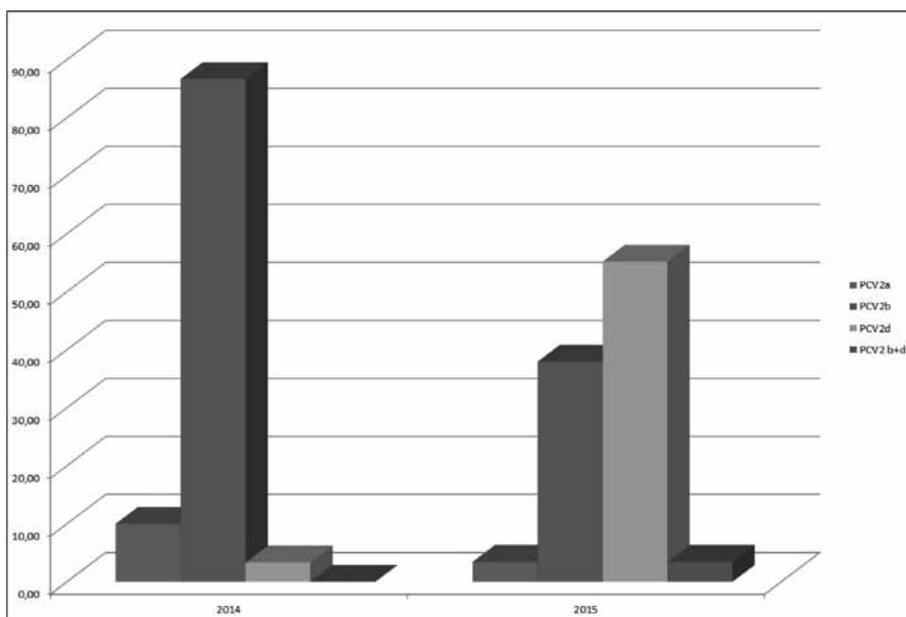


Grafico delle frequenze dei genotipi di PCV2 negli allevamenti considerati, distinte per anno

#### **BIBLIOGRAFIA:**

1. Allan, G., McNeilly, F., Ellis, J., Krakowka, S., 2001. Neonatal vaccination for M hyopneumonia and PMWS: a field trial, *Pig J* 48, 1-15.
2. Allan, G.M., McNeilly, F., Kennedy, S., Meehan, B., Ellis, J., Krakowka, S., 2000. Immunostimulation, PCV-2 and PMWS, *Vet Rec* 147 (6), 170-171.
3. Cortey, M., Olvera, A., Grau-Roma, L., Segales, J., 2011. Further comments on porcine circovirus type 2 (PCV2) genotype definition and nomenclature, *Vet Microbiol* 149, 522-523.
4. Eddicks, M., Fux, R., Szikora, F., Eddicks, L., Majzoub-Altweck, M., Hermanns, W., Sutter, G., Palzer, A., Banholzer, E., Ritzmann, M., 2015. Detection of a new cluster of porcine circovirus type 2b strains in domestic pigs in Germany, *Vet Microbiol* 176 (3-4), 337-343.
5. Ellis, J., 2014. Porcine Circovirus: A Historical Perspective, *Veterinary Pathology Online* 51 (2), 315-327.
6. Faccini, S., Nigrelli, A.D., Franzini, G., Rosignoli, C., Barbieri, I., Alborali, G.L., Boniotti, M.B., 2011. Effects of DNA extraction method on Porcine circovirus-2 real-time polymerase chain reaction quantification in swine lymph node samples, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23 (6), 1189-1196.
7. Franzo, G., Cortey, M., De Castro, A., Alessandra, M.M., Piovezan, U., Szabo, M., 2015. Genetic characterisation of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: an opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution, *Vet Microbiol* 178 (1-2), 158-162.
8. Franzo, G., Cortey, M., Castro, Alessandra Marnie Martins Gomes de, Piovezan, U., Szabo, M.P.J., Drigo, M., Segalés, J., Richtzenhain, L.J., 2015. Genetic characterisation of Porcine circovirus type 2 (PCV2) strains from feral pigs in the Brazilian Pantanal: An opportunity to reconstruct the history of PCV2 evolution, *Vet Microbiol* 178 (1-2), 158-162.
9. Franzo, G., Cortey, M., Olvera, A., Novosel, D., De Castro, A., Biagini, P., Segales, J., Drigo, M., 2015. Revisiting the taxonomical classification of Porcine Circovirus type 2 (PCV2):

still a real challenge, *Virology Journal* 12 (1), 131.

10. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Dotto, G., Gigli, A., Ceglie, L., Drigo, M., 2015. International trades, local spread and viral evolution: The case of porcine circovirus type 2 (PCV2) strains heterogeneity in Italy, *Infection, Genetics and Evolution* 32 (0), 409-415.

11. 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 (1), 23-32.

12. Grau-Roma, L., Hjulsager, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., López-Soria, S., Enøe, C., Casal, J., Bøtner, A., Nofrarias, M., Bille-Hansen, V., Fraile, L., Baekbo, P., Segalés, J., Larsen, L.E., 2009. Infection, excretion and seroconversion dynamics of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs from post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected farms in Spain and Denmark, *Vet Microbiol* 135 (3-4), 272-282.

13. Harding, J.C., Baker, C., Rhodes, C., McIntosh, K.A., Bonneau, M., 2009. Ring tests to evaluate the performance of Porcine circovirus-2 (PCV-2) polymerase chain reaction (PCR) assays used in North American diagnostic laboratories, *Can J Vet Res* 73 (1), 7-14.

14. Harding, J.C., Baker, C.D., Tumber, A., McIntosh, K.A., Parker, S.E., Middleton, D.M., Hill, J.E., Ellis, J.A., Krakowka, S., 2008. Porcine circovirus-2 DNA concentration distinguishes wasting from nonwasting pigs and is correlated with lesion distribution, severity, and nucleocapsid staining intensity, *J Vet Diagn Invest* 20 (3), 274-282.

15. Harmon, K.M., Gauger, P.C., Zhang, J., Pineyro, P.E., Dunn, D.D., Chriswell, A.J., 2015. Whole-Genome Sequences of Novel Porcine Circovirus Type 2 Viruses Detected in Swine from Mexico and the United States, *Genome Announc* 3 (6), 10.1128/genomeA.01315-15.

16. Hjulsager, C.K., Grau-Roma, L., Sibila, M., Enøe, C., Larsen, L., Segalés, J., 2009. Inter-laboratory and inter-assay comparison on two real-time PCR techniques for quantification of PCV2 nucleic acid extracted from field samples, *Vet Microbiol* 133 (1-2), 172-178.

17. Huynh, T.M.L., Nguyen, B.H., Nguyen, V.G., Dang, H.A., Mai, T.N., Tran, T.H.G., Ngo, M.H., Le, V.T., Vu, T.N., Ta, T.K.C., Vo, V.H., Kim, H.K., Park, B.K., 2014. Phylogenetic and Phylogeographic Analyses of Porcine Circovirus Type 2 Among Pig Farms in Vietnam, *Transboundary and Emerging Diseases* 61 (6), e25-e34.

18. Kekarainen, T., Gonzalez, A., Llorens, A., Segales, J., 2014. Genetic variability of porcine circovirus 2 in vaccinating and non-vaccinating commercial farms, *J Gen Virol* 95 (Pt 8), 1734-1742.

19. Kekarainen, T., McCullough, K., Fort, M., Fossum, C., Segales, J., Allan, G.M., 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2, *Vet Immunol Immunopathol* 136 (3-4), 185-193.

20. Krakowka, S., Ellis, J.A., McNeilly, F., Ringler, S., Rings, D.M., Allan, G., 2001. Activation of the Immune System is the Pivotal Event in the Production of Wasting Disease in Pigs Infected with Porcine Circovirus-2 (PCV-2), *Veterinary Pathology Online* 38 (1), 31-42.

21. Lv, Q.Z., Guo, K.K., Zhang, Y.M., 2014. Current understanding of genomic DNA of porcine circovirus type 2, *Virus Genes* 49 (1), 1-10.

22. Olvera, A., Cortey, M., Segales, J., 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality, *Virology* 357, 175-185.

23. Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs, *J Virol Methods* 117 (1), 75-80.

24. Opriessnig, T., Gerber, P.F., Xiao, C.T., Mogler, M., Halbur, P.G., 2014. A commercial vaccine based on PCV2a and an experimental vaccine based on a variant mPCV2b are both effective in protecting pigs against challenge with a 2013 U.S. variant mPCV2b strain, *Vaccine* 32 (2), 230-237.

25. Opriessnig, T., Yu, S., Gallup, J.M., Evans, R.B., Fenaux, M., Pallares, F., Thacker, E.L., Brockus, C.W., Ackermann, M.R., Thomas, P., Meng, X.J., Halbur, P.G., 2003. Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus, *Vet Pathol* 40, 521-529.
26. Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2013. Molecular analysis of Porcine Circovirus Type 2 strains from Uruguay: Evidence for natural occurring recombination, *Infection, Genetics and Evolution* 19 (0), 23-31.
27. Ramos, N., Mirazo, S., Castro, G., Arbiza, J., 2015. First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay, *Infection, Genetics and Evolution* 33 (0), 320-323.
28. Salgado, R.L., Vidigal, P.M., de Souza, L.F., Onofre, T.S., Gonzaga, N.F., Eller, M.R., Bressan, G.C., Fietto, J.L., Almeida, M.R., Silva Junior, A., 2014. Identification of an Emergent Porcine Circovirus-2 in Vaccinated Pigs from a Brazilian Farm during a Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome Outbreak, *Genome Announc* 2 (2), 10.1128/genomeA.00163-14.
29. Savic, B., Milicevic, V., Jakic-Dimic, D., Bojkovski, J., Prodanovic, R., Kureljusic, B., Potkonjak, A., Savic, B., 2012. Genetic characterization and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) in Serbia, *Arch Virol* 157 (1), 21-28.
30. Segales, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res* 164 (1-2), 10-19.
31. Segales, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2005. Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev* 6 (2), 119-142.
32. Segales, J., Calsamiglia, M., Olvera, A., Sibila, M., Badiella, L., Domingo, M., 2005. Quantification of porcine circovirus type 2 (PCV2) DNA in serum and tonsillar, nasal, tracheo-bronchial, urinary and faecal swabs of pigs with and without postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), *Vet Microbiol* 111 (3-4), 223-229.
33. Segales, J., Olvera, A., Grau-Roma, L., Charreyre, C., Nauwynck, H., Larsen, L., Dupont, K., McCullough, K., Ellis, J., Krakowka, S., Mankertz, A., Fredholm, M., Fossum, C., Timmusk, S., Stockhofe-Zurwieden, N., Beattie, V., Armstrong, D., Grassland, B., Baekbo, P., Allan, G., 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature, *Vet Rec* 162, 867-868.
34. Segalés, J., 2012. Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res* 164 (1-2), 10-19.
35. Ssemadaali, M.A., Ilha, M., Ramamoorthy, S., 2015. Genetic diversity of porcine circovirus type 2 and implications for detection and control, *Res Vet Sci* 103, 179-186.
36. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0, *Mol Biol Evol* 30 (12), 2725-2729.
37. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, *Virus Res* 145, 151-156.
38. Wang, F., Guo, X., Ge, X., Wang, Z., Chen, Y., Cha, Z., Yang, H., 2009. Genetic variation analysis of Chinese strains of porcine circovirus type 2, *Virus Res* 145 (1), 151-156.
39. Wei, C., Zhang, M., Chen, Y., Xie, J., Huang, Z., Zhu, W., Xu, T., Cao, Z., Zhou, P., Su, S., Zhang, G., 2013. Genetic evolution and phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 infections in southern China from 2011 to 2012, *Infect Genet Evol* 17, 87-92.
40. Xiao, C.T., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2012. Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States, *J Virol* 86 (22), 12469-12.
41. Xiao, C., Halbur, P.G., Opriessnig, T., 2015. Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2 genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d, *Journal of General Virology*.

## MONITORAGGIO DEI PRRSV E SIV IN SUINI SVEZZATI MEDIANTE L'USO DI FLUIDI ORALI

GIACOMINI E.<sup>[1]</sup>, LAZZARO M.<sup>[1]</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>[1]</sup>, SCALI F.<sup>[1]</sup>, PASQUALI P.<sup>[2]</sup>,  
AMADORI M.<sup>[1]</sup>, RUGGERI J.<sup>[1]</sup>, BARDINI R.<sup>[3]</sup>, GAMBA F.<sup>[4]</sup>, LEOTTI G.<sup>[5]</sup>,  
ANA M.<sup>[1]</sup>, ALBORALI G.L.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia Emilia Romagna ~ Brescia ~ Italy,

<sup>[2]</sup>Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy, <sup>[3]</sup>Trow Nutrition Italia SpA ~ Verona ~ Italy, <sup>[4]</sup>  
Libero Professionista ~ Mantova ~ Italy, <sup>[5]</sup>Meril Italia SpA ~ Milano ~ Italy

Keywords: SIV, PRRSV, Oral fluid

### Riassunto

Le patologie respiratorie nell'allevamento suino sono la principale causa di perdite economiche. Di conseguenza, negli anni si sono sviluppate pratiche di management e di profilassi per il loro controllo. Questo studio è stato svolto in 8 allevamenti, facendo dei prelievi in suini allo svezzamento di età compresa fra 30-90 giorni. E' stato prelevato il sangue venoso da ogni soggetto, assieme a tamponi nasali (TN), poi analizzati in pool da 5 animali l'uno, e la saliva (OF). Le matrici sono state analizzate per la ricerca di virus Porcine Reproductive Respiratory Syndrome (PRRSV) e Virus Influenzale Suino (SIV) tramite real-time RT-PCR. I risultati per PRRSV sul siero di sangue mostrano una maggiore prevalenza di campioni positivi con l'avanzare dell'età, con valori più che raddoppiati da 30 a 90 giorni di vita sia per PRRSV che per SIV. La percentuale di concordanza in RT-PCR fra siero e OF è stata pari a 83% mentre quella fra TN e OF era del 92%.

### Abstract

Respiratory diseases represent causes of major economic losses in pig production. Therefore, management approaches and prophylaxis plans have been developed for their control and treatments. This study was conducted in 8 farms by sampling 1-3 months old pigs. Blood samples and nasal swabs (NS) were taken from a total of 45 animals and examined as pool of 5 animals. In addition, 3 oral fluids (OF) at each time point were taken. The three types of sample were examined for Porcine Reproductive Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and Swine Influenza Virus (SIV) by real-time RT-PCR. The results of PRRSV test on blood serum indicated an increasing of prevalence related to age, being the values for both PRRSV and SIV more than doubled between 30 and 90 dd of age. The agreement with RT-PCR for PRRSV between serum and OF was 83% and that between TN and OF was 92%.

### INTRODUZIONE:

Il controllo e la gestione delle principali patologie respiratorie nell'allevamento suino, quali la Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRS - porcine reproductive respiratory disease) e Influenza (SI - swine influenza) sono di fondamentale importanza nell'ottica dell'impatto economico che queste malattie possono avere in azienda. Basti pensare che la sola infezione da PRRSV negli Stati Uniti provoca un costo annuo stimato di 664 milioni di dollari (6). L'intervento immunizzante può essere d'aiuto nel controllo di SIV anche se l'efficacia di questa strategia è talvolta inficiata dalla estrema varietà di ceppi circolanti (11). Clinicamente SIV si manifesta con febbre, anoressia, letargia, tosse secca, starnuti e spesso ritardo della crescita (3, 8). Nella prospettiva del controllo delle patologie respiratorie del suino va considerata la non rara la co-infezione con altri agenti batterici o virali tra cui lo stesso PRRSV (2), che provoca un aumento della gravità

della malattia (4). L'assenza di PRRSV circolante in suinetti allo svezzamento può essere un indicatore della corretta gestione e controllo della patologia (7). Anche una precisa e rapida diagnosi di queste patologie assume un importante ruolo ai fini del controllo della circolazione virale e sono pertanto necessari metodi semplici, rapidi e non invasivi. I tamponi nasali per la ricerca di SIV sia nell'uomo che nel suino sono da considerarsi i materiali di riferimento (5). Tuttavia, l'uso di matrici comuni come il sangue o tamponi nasali può essere sostituito o talvolta integrato con il prelievo di liquidi orali. L'uso della saliva come matrice diagnostica è una metodica consolidata in campo umano (10). Nel settore zootecnico il prelievo di liquidi orali nel suino è stato messo a punto in condizioni di campo nel 2008 e rappresenta oggi un'alternativa per la diagnosi e la ricerca di PRRSV (9) e SIV (5). Si tratta di una pratica di facile esecuzione, che riduce notevolmente i costi e l'impegno logistico ed organizzativo connesso all'esecuzione dei prelievi di sangue (1). I liquidi orali vengono raccolti tramite corde di cotone lasciate masticare ai suini e poi spremute. Lo scopo del nostro studio è stato capire la circolazione di PRRSV e SIV nella fase di svezzamento e analizzare la sensibilità delle diverse matrici per la rilevazione di questi virus.

### **MATERIALI E METODI:**

Questo studio è stato condotto in 7 allevamenti con riproduttori, 5 a ciclo aperto, 2 a ciclo chiuso e un'azienda di svezzamento situati tutti in un'area ad alta densità suinicola. In 5 allevamenti si pratica la vaccinazione PRRSV nelle scrofe usando un vaccino vivo attenuato mentre in una sola azienda viene attuata la profilassi nei confronti di SIV. Il protocollo di campionamento ha coinvolto 45 suini scelti in forma random in 9 box (5 per box) divisi in 3 fasce d'età distanziate di un mese (15 per fascia) partendo da animali di 30 gg di vita fino a suini di 90 gg di vita (T0, T1, T2). In ogni classe d'età sono stati eseguiti 15 prelievi di sangue, 15 tamponi nasali (TN) e 3 campioni di liquidi orali (OF). Per ogni azienda sono stati raccolti un totale di 45 campioni di sangue, 45 TN e 9 OF ed analizzati 9 pool di sangue, 9 TN e 9 OF. I campioni di sangue sono stati analizzati a pool da 5 (3 pool per classe d'età) per la ricerca di PRRSV tramite RT-PCR, i tamponi nasali (TN) sono stati analizzati a pool da 5 (3 pool) per la ricerca di SIV tramite RT-PCR; i campioni di OF sono stati ottenuti tramite l'applicazione di una corda in ciascun box che è stata lasciata masticare per 30 minuti; la corda è stata in seguito strizzata per raccogliere il liquido orale in sacchetto stomacher. I campioni così ottenuti sono stati analizzati tramite RT-PCR verso entrambi i virus, I campioni prelevati sono stati trasportati mantenendo la catena del freddo alla sezione diagnostica IZSLER di Brescia. Per i campioni risultati positivi a SIV si è proceduto inoltre alla tipizzazione del ceppo con PCR multiplex.

### **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

#### **PRRSv**

Sette degli 8 allevamenti considerati sono risultati essere positivi in PCR a PRRSV. Prendendo in considerazione gli 8 allevamenti, i pool di campioni di sangue risultati positivi sono stati 4/24 al T0, 10/24 al T1 e 10/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un pool di sieri è risultato positivo sono stati 2, 5 e 5 rispettivamente per il T0, T1 e T2. I campioni di OF risultati positivi 5/24 sono stati al T0, 8/24 al T1 e 15/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un campione OF è risultato positivo sono stati 3, 4 e 5 rispettivamente per il T0, T1 e T2 (Tabella 1). La percentuale di concordanza in RT-PCR fra siero e OF è stata pari a 83%. SIV Sei degli 8 allevamenti considerati sono risultati positivi in RT-PCR a SIV. I pool di tamponi nasali risultati positivi sono stati 2 /24 al T0, 7 / 24 al T1 e 9 /24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno uno di tali pool è risultato positivo sono stati 1, 4 e 4 rispettivamente per il T0, T1 e T2. I campioni di OF risultati positivi sono stati 3/24 al T0, 5/24 al T1 e 7/24 al T2, mentre gli allevamenti dove almeno un campione è risultato positivo sono stati 2, 3 e 4 rispettivamente per il T0, T1 e T2 (Tabella 2). La percentuale di concordanza fra TN e OF in RT-PCR è stata pari a 92%. La tipizzazione dei tamponi nasali ri-

sultati positivi a SIV ha rivelato che in 3 aziende il ceppo circolante era H1N2 e in una sola H1N1. In tre allevamenti non si è potuto isolare il virus. Nessun campione è risultato positivo in RT-PCR nei confronti di H1N1 ceppo pandemico (Tabella 3).

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'obiettivo di questo studio preliminare è stato confrontare le diverse matrici e valutare la loro idoneità per l'isolamento di PRRSV e SIV. L'elevata percentuale di concordanza ottenuta tra siero e OF per PRRSV (83 %) e fra TN e OF per SIV (92%) conferma che gli OF rappresentano una reale alternativa alle matrici tradizionali per il monitoraggio di PRRSV e SIV negli svezzamenti. Il rispetto di un protocollo di campionamento standardizzato, la tempestività di invio e il mantenimento della catena del freddo durante il trasporto al laboratorio sono requisiti fondamentali per mettere in evidenza la circolazione di questi virus in gruppi di suini con diverse età presenti nello stesso svezzamento. Il confronto dei risultati ottenuti evidenzia che gli OF possono essere utilizzati per il monitoraggio di aziende da svezzamento con elevata e bassa circolazione virale. Dalle analisi eseguite si evince che per entrambe le patologie ed entrambe le matrici c'è una positività crescente con il progredire dell'età di campionamento. Nell'azienda "sito 2" non sono state evidenziate positività per PRRSV e SIV, suggerendo che l'utilizzo OF può essere allargata anche ad allevamenti negativi e ad aziende multisito con elevati standard sanitari.

|         |           | PRRS   |    |    |    |    |    |
|---------|-----------|--------|----|----|----|----|----|
|         |           | sangue |    |    | OF |    |    |
| AZIENDA | TIPOLOGIA | T0     | T1 | T2 | T0 | T1 | T2 |
| 1       | CA        | 0      | 0  | 1  | 0  | 0  | 3  |
| 2       | CA        | 0      | 2  | 3  | 0  | 2  | 3  |
| 3       | CA        | 0      | 1  | 0  | 1  | 2  | 3  |
| 4       | CA        | 0      | 0  | 2  | 0  | 0  | 3  |
| 5       | CA        | 1      | 2  | 2  | 1  | 2  | 0  |
| 6       | CC        | 3      | 2  | 0  | 3  | 0  | 0  |
| 7       | CC        | 0      | 3  | 2  | 0  | 2  | 3  |
| 8       | SITO 2    | 0      | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

Tabella 1. Risultati delle analisi per PRRSV in RT-PCR da sangue e saliva

|         |           | SIV |    |    |    |    |    |
|---------|-----------|-----|----|----|----|----|----|
|         |           | TN  |    |    | OF |    |    |
| AZIENDA | TIPOLOGIA | T0  | T1 | T2 | T0 | T1 | T2 |
| 1       | CA        | 0   | 0  | 0  | 1  | 0  | 0  |
| 2       | CA        | 0   | 3  | 3  | 0  | 3  | 3  |
| 3       | CA        | 2   | 1  | 1  | 2  | 1  | 1  |
| 4       | CA        | 0   | 0  | 3  | 0  | 0  | 1  |
| 5       | CA        | 0   | 1  | 2  | 0  | 0  | 2  |
| 6       | CC        | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 7       | CC        | 0   | 2  | 0  | 0  | 1  | 0  |
| 8       | SITO 2    | 0   | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  |

Tabella 2. Risultati delle analisi per SIV in RT-PCR da sangue e saliva

| AZIENDA | TIPOLOGIA | TIPIZZAZIONE |
|---------|-----------|--------------|
| 1       | SITO 1    | H1N2         |
| 2       | CA        | H1N2         |
| 3       | CA        | H1N2         |
| 4       | CA        | NON ISOLATO  |
| 5       | CA        | NON ISOLATO  |
| 6       | CC        | NON ISOLATO  |
| 7       | CC        | H1N1         |
| 8       | SITO 2    | 0            |

Tabella 3. Esiti della tipizzazione dei ceppi influenzali SIV

### BIBLIOGRAFIA:

1. Bilato D., Drigo M., Pasotto D. and Amadori M., 2014. Analisi comparativa di parametri immunologici sierici, mucosali e celluloso-mediati dopo infezione di campo da virus PRRS (PRRSV) Atti Della Società Italiana Di Patologia Ed Allevamento Dei Suini Meeting Annuale Vol. XL; pag. 205-209.
2. Choi Y.K., Goyal S.M. and Joo H.S., 2003. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs. Canadian Veterinary Journal-Revue Veterinaire Canadienne. Vol. 44 (issue 9); pag. 735-737.
3. Decorte I., Steensels M., Lambrecht B., Cay A.B. and De Regge N., 2015. Detection and Isolation of Swine Influenza A Virus in Spiked Oral Fluid and Samples from Individually Housed, Experimentally Infected Pigs: Potential Role of Porcine Oral Fluid in Active Influenza A Virus Surveillance in Swine. Plos One. Vol. 10 (issue 10).
4. Dobrescu I., Levast B., Lai K., Delgado-Ortega M., Walker S., Banman S., Townsend H., Simon G., Zhou Y., Gerdtts V. and Meurens F., 2014. In vitro and ex vivo analyses of co-infections with swine influenza and porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. Veterinary Microbiology. Vol. 169 (issue 1-2); pag. 18-32.
5. Goodell C.K., Prickett J., Kittawornrat A., Zhou F., Rauh R., Nelson W., O'Connell C., Burrell A., Wang C., Yoon K.J. and Zimmerman J.J., 2013. Probability of detecting influenza A virus subtypes H1N1 and H3N2 in individual pig nasal swabs and pen-based oral fluid specimens over time. Veterinary Microbiology. Vol. 166 (issue 3-4); pag. 450-60.
6. Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Neumann E.J., Zimmerman J.J., Rotto H.F., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L. and Haley C.A., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. Journal of Swine Health and Production. Vol. 21 (issue 2); pag. 72-84.
7. Holtkamp D.J., Polson D.D. and Torremorell M., 2011. Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. Journal of Swine Health and Production. Vol. 19 (issue 1); pag. 44-56.
8. Olsen C., Brown I., Easterday B. and Van Reeth K. 2006 Swine influenza in Diseases of Swine, Straw B., Zimmerman J., D'Allaire S. and Taylor D. (Eds) Blackwell: Oxford. pag. 469-482.
9. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.J., Evans R.B. and Zimmerman J.J., 2008. Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 20 (issue 2); pag. 156-163.
10. Prickett J.R. and Zimmerman J.J., 2010. The development of oral fluid-based diagnostics and applications in veterinary medicine. Anim Health Res Rev. Vol. 11 (issue 2); pag. 207-16.
11. Van Reeth K. and Ma W.J., 2013. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change-That's the Question. Swine Influenza. Vol. 370; pag. 173-200.





## **POSTERS**



# INFERTILITÀ ESTIVA: EFFETTO DI UN MANGIME COMPLEMENTARE (LIANOL FERTI®) SOMMINISTRATO ALLE SCROFE NEL PERI-SVEZZAMENTO

BEKAERT S.<sup>[1]</sup>, MAZZONI C.<sup>[2]</sup>, LEONE M.<sup>[2]</sup>, AMORICO A.<sup>[2]</sup>, MONDIN P.<sup>[1]</sup>, FESTI G.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Huvepharma ~ Antwerp ~ Belgium, <sup>[2]</sup>Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy

Keywords: Seasonal infertility, Heat stress, Complementary feed

## Riassunto

Durante l'estate, molte scrofaie vanno incontro a problematiche riproduttive più o meno gravi comunemente riconosciute con il termine "infertilità stagionale" e perlopiù attribuite allo stress del caldo. Lo scopo del presente lavoro è stato valutare gli effetti di un mangime complementare (Lianol Ferti®) somministrato alle scrofe nei giorni precedenti e successivi lo svezzamento. Lo studio è stato condotto in una scrofaia commerciale intensiva durante il mese di agosto, dividendo le bande di scrofe allo svezzamento in due gruppi: il gruppo controllo (n = 75 scrofe) ed il gruppo trattato (n = 73 scrofe). I parametri osservati sono stati: l'intervallo svezzamento-prima inseminazione, l'intervallo svezzamento-gravidanza, tasso di gravidanza all'ecografia (distinguendo tra gli assorbimenti embrionali e inseminazioni non andate a buon fine), ed il numero di scrofe ritornate in estro. Al parto successivo, sono stati annotati il numero di suinetti nati totali, il numero dei nati morti ed i mummificati. L'analisi dei dati è stata effettuata tenendo conto di sottoclassi di scrofe create per ordine di parto e condizione corporea. L'effetto principale del trattamento è emerso durante il parto seguente, con 1,3 suinetti per scrofa in più nel gruppo trattato (P = 0,026), in particolare nelle scrofe magre, grasse e mature. Inoltre sono emerse anche una tendenza alla riduzione dell'intervallo svezzamento-gravidanza (P = 0,08) con piena significatività statistica nelle scrofe di medio spessore del lardo e nelle giovani, ed una tendenza alla riduzione dei riassorbimenti embrionali e del numero di scrofe tornate in estro (P = 0,08). Somministrare un mangime complementare (Lianol® Ferti) durante l'estate alle scrofe nel peri-svezzamento migliora le performance che altrimenti risentirebbero nell'infertilità stagionale legata allo stress da caldo.

## Abstract

During summer, many sow farms experience a variety of reproductive problems commonly related to the "summer infertility", mostly attributed to heat stress. Aim of the present study was to investigate the effect of supplying complementary feed stuff (Lianol® Ferti) around weaning. The study was conducted on a commercial breeding farm during August, dividing sows of the production groups into Control (n = 75 sows) and treated (n = 73 sows) animals. Observed parameters were: weaning-first insemination interval, weaning-pregnancy interval, pregnancy rate at ultrasound scan (embryonal reabsorption and unsuccessful insemination), number of sows returned in oestrus. In the next farrowing, number of total born piglets, still born and mummified were also recorded. During statistical analyses, sub-classes of sows were created for different ages and body condition. The main effect of treatment on sows was shown the farrowing after, with 1,3 piglets per sow more (P = 0,026), in particular in slim, fat and mature subclasses. Furthermore, tendencies in the reduction of weaning-pregnancy interval (P = 0,08; fully significant in middle-size sows and young), of embryonal reabsorption and sows returned in oestrus (P = 0,08) were shown. To supply during the summer a complementary feed stuff (Lianol® Ferti) to sows around weaning improve reproductive performance related to the seasonal infertility.

## **INTRODUZIONE:**

Durante l'estate, molte scrofaie vanno incontro a problematiche riproduttive più o meno gravi quali l'allungamento dell'intervallo svezzamento-estro, bassi tassi di concepimento ed elevata mortalità embrionale. Il fenomeno, comunemente definito come "infertilità stagionale", è perlopiù attribuito allo stress del caldo ed è ben conosciuto soprattutto nei Paesi mediterranei tra cui l'Italia, che vede arrivare le temperature estive ben oltre la media europea. In aggiunta alle strategie ambientali e ciascuna azienda è in grado di mettere in atto per ridurre lo stress da caldo delle proprie scrofe, interventi non-termici possono essere utili strumenti per migliorare le performance riproduttive. Lo scopo del presente lavoro è stato valutare gli effetti di un mangime complementare (Lianol Ferti®) somministrato alle scrofe nei giorni precedenti e successivi lo svezzamento. L'alimento, composto da proteine ottenute dalla fermentazione della patata, contiene molecole dalle proprietà prometaboliche originate dallo stesso processo di fermentazione, e si pone l'obiettivo di ridurre gli effetti di un bilancio energetico negativo. Le performance delle scrofe sono state monitorate dallo svezzamento fino al parto successivo.

## **MATERIALI E METODI:**

Lo studio è stato condotto in una scrofaia commerciale intensiva situata nella provincia di Piacenza in Italia, nella quale le temperature raggiunte durante l'estate rappresentano storicamente un problema ed una sfida per i risultati riproduttivi. Il periodo di osservazione è stato agosto, durante il quale le bande di scrofe che venivano svezzate erano casualmente divise in due gruppi: il gruppo controllo (n = 75 scrofe) ed il gruppo trattato (n = 73 scrofe). Ad esclusione del trattamento con il mangime complementare, i due gruppi alloggiavano nelle stesse strutture ed erano sottoposti a management identico. Le scrofe pluripare hanno ricevuto una tavoletta di Lianol® Ferti Tablet al giorno somministrata durante il pasto, iniziando il trattamento tre giorni prima dello svezzamento fino a tre giorni dopo. Le scrofette invece (13,3% nel gruppo controllo; 12,3% nel gruppo trattato) hanno ricevuto la tavoletta giornaliera per cinque giorni consecutivi iniziati subito dopo la fine del trattamento di sincronizzazione degli estri. I parametri osservati sono stati: l'intervallo svezzamento-prima inseminazione, l'intervallo svezzamento-gravidanza, tasso di gravidanza all'ecografia (distinguendo tra gli assorbimenti embrionali e inseminazioni non andate a buon fine), ed il numero di scrofe ritornate in estro. I ritorni in estro sono stati classificati in tre tipologie, secondo quanto suggerito da De Rensis et al. (1): regolare di tipo 1 (intervallo di 18-23 giorni); regolare di tipo 2 (intervallo di 36-48 giorni); irregolare di tipo 3 (intervallo di 24-35 giorni). Al parto successivo, sono stati annotati il numero di suinetti nati totali, il numero dei nati morti ed i mummificati. L'analisi statistica dei dati è stata condotta tramite uno student t-test per il confronto tra medie, ed un test del chi-quadro per il confronto di dati espressi in percentuale. Inoltre, sono state formate delle sottoclassi di scrofe considerando l'ordine di parto (primipare: 0 parti; giovani: 1-2 parti; mature:  $\geq 3$  parti) e la condizione corporea valutata tramite lo spessore del lardo in P2 (Renco Lean-Meater, S.E.C. Repro Inc, Canada; Magre:  $\leq 17$  mm; medie: 18-19 mm; grasse:  $\geq 20$  mm).

## **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

L'effetto principale del trattamento è emerso durante il parto seguente. Il numero di nati vivi totali è aumentato di 1,3 suinetti per scrofa nel gruppo trattato (12,4 vs 11,1 suinetti;  $P = 0,026$ ). In particolare, il miglioramento delle performance è stato maggiore nella sotto-classi delle scrofe magre (12,5 vs 11,0 suinetti;  $P = 0,033$ ), delle scrofe grasse (12,9 vs 9,9 suinetti;  $P = 0,031$ ) e delle scrofe mature (12,3 vs 11,1 piglets;  $P = 0,026$ ). D'altra parte, la bibliografia riporta come la quantità di tessuto adiposo e/o muscolare della scrofa sia un parametro estremamente critico per la normale attività ovarica dopo lo svezzamento (2), e che un corretto spessore del lardo al parto consenta di ridurre il rischio di intervalli svezzamento-calore prolungati (3). A conferma, nel presente lavoro è emersa anche una tendenza alla riduzione dell'intervallo svezzamento-gravidanza (6,29 vs 9,28

days;  $P = 0,08$ ). Questa tendenza ha comunque raggiunto la piena significatività statistica nella sotto-classe delle scrofe di media condizione corporea (5,59 vs 12,37 days;  $P = 0,05$ ) e nelle scrofe giovani (5,24 vs 11,12 days;  $P = 0,05$ ), queste ultime notoriamente più a rischio di ridotte performance riproduttive nella stagione calda a causa delle loro relativamente scarse riserve corporee al parto (Figura 1). Un'ulteriore tendenza statistica è emersa anche per i riassorbimenti embrionali e per il numero di scrofe tornate in estro, entrambe ridotte nel gruppo di trattamento (rispettivamente: 2,7 vs 8,1%;  $P = 0,07$ ; 5,4 vs 9,3%;  $P = 0,08$ ) (Tabella 1). Tutte le scrofe tornate in estro sono rientrate nel ritorno irregolare di tipo 3, sebbene in bibliografia sia riportato tra Giugno ed Agosto un aumento di scrofe con ritorno in estro di tipo 1 rispetto al resto dell'anno. Al contrario, i ritorni irregolari di tipo 3 sono solitamente più frequenti tra Settembre ed Ottobre, quando è coinvolta quella che è nota con il nome di "infertilità autunnale". Nel presente lavoro, i ritorni irregolari di tipo 3 riscontrati sono indice di inseminazioni andate a buon fine ma che hanno portato ad una perdita embrionale tardiva. Concludendo, Somministrare un mangime complementare (Lianol® Ferti) durante l'estate alle scrofe nel peri-svezzamento migliora le performance che altrimenti risentirebbero nell'infertilità stagionale legata allo stress da caldo. In particolare, i risultati da sottolineare sono l'aumento di 1,3 suinetti nati totali per scrofa, e la tendenza alla riduzione dell'intervallo svezzamento-gravidanza, dei riassorbimenti embrionali e del numero di scrofe tornate in estro. Una scelta alimentare rappresenta certamente un intervento non-termico che può essere utile nelle scrofaie che storicamente risentono maggiormente dello stress da caldo durante l'estate.

| Variabili  | Controllo | Trattati | P-value |
|--|-----------|----------|---------|
| Intervallo svezzamento-prima inseminazione (media, giorni) | 4,67      | 4,41     | ns      |
| Intervallo svezzamento-gravidanza (media, giorni)          | 9,28      | 6,29     | 0,08    |
| Tasso di gravidanza all'ecografia (%)                      | 84,0      | 86,3     | ns      |
| - Riassorbimenti embrionali (%)                            | 8,1       | 2,7      | 0,07    |
| - Inseminazioni non andate a buon fine (%)                 | 8,0       | 10,7     | ns      |
| Numero di scrofe tornate in estro (%)                      | 9,3       | 5,4      | 0,08    |
| - inter-estro tipo 1 (%)                                   | 0,0       | 0,0      | ns      |
| - inter-estro tipo 2 (%)                                   | 0,0       | 0,0      | ns      |
| - inter-estro tipo 3 (%)                                   | 100       | 100      | ns      |
| Nati totali (n)  | 11,1      | 12,4     | 0,026   |
| Nati morti (%)   | 4,7       | 4,4      | ns      |
| Mummificati (%)  | 0,8       | 0,5      | ns      |

Tabella 1. Parametri riproduttivi delle scrofe dallo svezzamento al parto successivo. Ns = dato non significativo all'analisi statistica

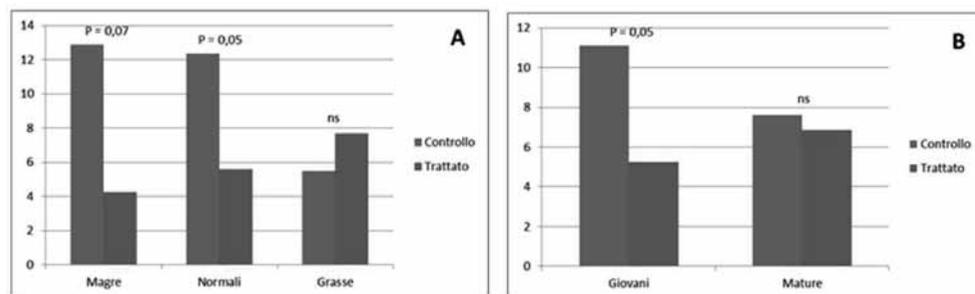


Figura 1. Intervalli svezzamento-gravidanza nelle sotto classi di scrofe per condizione corporea (A) e per ordine di parto (B).

**BIBLIOGRAFIA:**

1. De Rensis F., Mazzoni C., Scollo A., Bonilauri P., 2015. Distribution of regular and irregular inter-oestrus interval in sow during different period od the year in northern Italy. Atti del 7th European Symposium of Porcine Health and Management, 22-24 Aprile 2015, Nantes (FR).
2. Dourmad, J. Y., Etienne, M., Prunier, A., & Noblet, J. (1994). The effect of energy and protein intake of sows on their longevity: a review. *Livestock production science*, 40(2), 87-97.
3. Gourdine, J. L., Bidanel, J. P., Noblet, J., & Renaudeau, D. (2006). Effects of breed and season on performance of lactating sows in a tropical humid climate. *Journal of animal science*, 84(2), 360-369.

# EFFETTO DELL'INDUZIONE DEL PARTO CON D-CLOPROSTENOLO (VETEGLAN®) SULLE PERFORMANCE DI SCROFA E NIDIATA

ORTOLAN T.<sup>[1]</sup>, TONON F.<sup>[1]</sup>, MENCARELLI A.<sup>[2]</sup>, PAPPATERRA G.<sup>[3]</sup>

<sup>[1]</sup>*Suivet snc ~ Reggio Emilia ~ Italy*, <sup>[2]</sup>*Calier ~ Milano ~ Italy*, <sup>[3]</sup>*Calier ~ Barcellona ~ Spain*

Keywords: Farrowing induction, D-cloprostenol, Alfaprostol

## Riassunto

L'induzione del parto viene solitamente effettuata somministrando prostaglandine alla scrofa il giorno precedente il parto per permettere un'attenta e accurata supervisione della scrofa in travaglio e dei neonati. Scopo del presente lavoro, è stato quello di indagare l'effetto dell'induzione del parto tramite l'utilizzo di analoghi di sintesi delle prostaglandine (alfaprostolo e D-cloprostenolo), valutando sia le performance della scrofa durante il parto, sia i dati produttivi dei suinetti nei primi cinque giorni di vita. Per la prova sono state utilizzate 172 scrofe, suddivise in due gruppi di trattamento: un gruppo è stato indotto utilizzando D-cloprostenolo (n=85), per l'altro gruppo è stato utilizzato l'alfaprostolo (n=87). Sia alfaprostolo che D-cloprostenolo, si sono dimostrate molecole efficaci per l'induzione del parto delle scrofe. La sincronizzazione del parto ottenuta con questi metodi di induzione ha permesso una buona assistenza delle scrofe in travaglio, con l'obiettivo di ridurre la mortalità neonatale entro le prime 24 ore. I parametri produttivi non sono stati influenzati in maniera significativa nei gruppi di trattamento, come neanche la mortalità totale nei primi cinque giorni di vita dei suinetti. Tuttavia, il gruppo trattato con D-cloprostenolo ha mostrato una percentuale inferiore di suinetti schiacciati, come anche minori segnali di sofferenza fetale per asfissia. I risultati suggeriscono, con l'uso del D-cloprostenolo, un minore disturbo della scrofa e del suinetto durante le fasi espulsive del parto.

## Abstract

Farrowing induction is usually carried out by administering prostaglandin to the sow the day before farrowing, to allow a more careful and accurate supervision of sow and newborns. Aim of this study was to investigate the effect of induction using synthesis analogues of prostaglandin (Alfaprostol and D-cloprostenol), evaluating both the performance of the sow during farrowing and productive data of piglets in the first five days of life. A total of 172 sows, divided in two groups of treatment, were included in the study. One group was treated with D-cloprostenol (n=85) while the other was treated with Alfaprostol (n=87). Both Alfaprostol and D-cloprostenol were effective to induce farrowing in sows. The synchronization that was obtained with the two treatments allowed a good level of assistance during labor, which is known to be linked with a reduction of mortality during the first 24 hours. Production parameters were not influenced by treatment group, nor the total mortality during the first five days of the piglets' life. However, D-cloprostenol group showed a lower percentage of crushed piglets, as well as lower signs of foetal distress. The study results suggest a lower discomfort of sows and piglets during farrowing with the use of D-cloprostenol.

## INTRODUZIONE:

Nelle aziende suinicole che scelgono di indurre il parto delle proprie scrofe, l'obiettivo principale è quello di permettere una più attenta e accurata supervisione della scrofa in

travaglio e dei neonati, grazie alla sincronizzazione degli stessi in orario lavorativo al fine di ridurre il più possibile la mortalità neonatale (8). Non vanno comunque sottovalutati gli ulteriori vantaggi di poter programmare i parti nei giorni infrasettimanali, di gestire al meglio i baliaggi e di poter svezzare lo stesso giorno un maggior numero di suinetti della stessa età (12; 11).

L'induzione del parto viene solitamente effettuata somministrando prostaglandine alla scrofa il giorno precedente la data prevista del parto, siano esse di origine naturale (PGF $2\alpha$ ) oppure analoghi sintetici come alfaprostolo e D-cloprostenolo. Per completare il protocollo di induzione possono essere somministrate anche altre sostanze ad azione ormonale come, ad esempio, l'ossitocina (8). Nell'ultimo decennio la ricerca scientifica ha esplorato e approfondito diversi aspetti riproduttivi e produttivi legati all'induzione del parto, come ad esempio gli effetti su peso alla nascita e vitalità dei suinetti (11), mortalità e accrescimenti durante la lattazione (5), fino ad arrivare allo studio delle alterazioni della concentrazione di prolattina e della composizione del colostro nelle scrofe (4). Gli studi che finora hanno comparato l'attività di diverse molecole di sintesi sono però risalenti a un periodo piuttosto remoto (2), sebbene negli ultimi anni i progressi farmacologici non siano mancati. Scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di indagare l'effetto dell'induzione del parto tramite l'utilizzo di analoghi di sintesi delle prostaglandine (alfaprostolo e D-cloprostenolo), valutando sia le performance della scrofa durante il travaglio sia i dati produttivi dei suinetti nei primi cinque giorni di vita.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali e management**

Lo studio è stato condotto in un allevamento intensivo situato nel Nord-est Italia, nei mesi di luglio e agosto 2015. Sono state prese in esame 172 scrofe di genetica ibrida, con carriera riproduttiva compresa dal 2<sup>a</sup> al 17<sup>a</sup> parto, ed i loro suinetti per un totale di 2084 neonati. Le scrofe, dopo essere state alloggiate in gabbie-parto convenzionali e gestite con procedure standard aziendali, sono state divise casualmente in due gruppi di trattamento: trattamento 1: 85 scrofe hanno ricevuto 0,075 mg di D-cloprostenolo per via intramuscolare (1 ml di Veteglan<sup>®</sup>, conformemente alla dose raccomandata); trattamento 2: 87 scrofe hanno ricevuto 2 mg di alfaprostol per via intramuscolare (1 ml, conformemente alla dose raccomandata). Le scrofe sono state inoculate 24 h prima del tempo programmato per l'inizio del travaglio; la mattina del giorno previsto per il parto sono stati somministrati 2ml di ossitocina alle scrofe che non avevano ancora iniziato il travaglio. Le scrofe che hanno partorito durante le ore diurne e lavorative sono state assistite da un veterinario qualificato. Un sommario baliaggio delle nidiate è stato effettuato separatamente in ciascun gruppo entro le prime 24 ore di vita, al fine di pareggiare in numero e dimensione i suinetti per nidiate.

### **Parametri valutati**

Sono state valutate le performance di scrofa e nidiate, quali: durata del parto, percentuale di scrofe che hanno partorito in orario lavorativo (dalle ore 07.00 alle ore 15.30), numero totale di nati, numero di suinetti nati vivi, numero di nati morti e di mummificati, numero di esplorazioni uterine e mortalità dei suinetti durante i primi cinque giorni di vita con relativa causa di morte (morsicatura della scrofa, schiacciamento, inedia, diarrea, altro). Per la valutazione del grado di asfissia perinatale è stato registrato per ciascun suinetto l'imbrattamento cutaneo da meconio e sangue utilizzando una scala a tre livelli: 0 = assenza di meconio sulla cute; 1 = tracce di meconio sulla cute; 2 = evidente presenza di meconio sulla cute.

## Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS (SAS 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC) e XLSTAT (Addinsoft). Il numero di nati morti e di mummificati, il numero di esplorazioni uterine e il grado di imbrattamento cutaneo sono stati analizzati tramite il test non parametrico di Kruskal–Wallis. I dati relativi alla mortalità e alle cause della morte sono stati analizzati utilizzando il test del chi quadro ( $\chi^2$ -test). Tutte le altre variabili sono state analizzate mediante la procedura ANOVA (Proc GLM).

## RISULTATI E DISCUSSIONE:

La prova è durata sei settimane, a partire dalla metà di luglio per concludersi alla fine di agosto. Complessivamente, durante tale periodo, le scrofe che hanno partorito in orario lavorativo (dalle 07:00 alle 15:30) e che quindi ne ha consentito l'assistenza, sono risultate il 70,6% per il trattamento 1 indotte con D-cloprostenolo ed il 71,3% per il trattamento con alfaprostolo. In particolar modo, le scrofe che hanno iniziato il parto durante la notte (prima delle 07:00) sono state il 22,3% nel gruppo D-cloprostenolo e il 20,7% nel gruppo alfaprostolo; le scrofe che hanno partorito dopo le 15:30 sono state il 7,1% nel gruppo D-cloprostenolo e l'8,0% nel gruppo alfaprostolo. Le scrofe per le quali è stato deciso l'ulteriore intervento farmacologico con ossitocina sono state il 78,8% nel gruppo D-cloprostenolo e l'85,1% nel gruppo alfaprostolo ( $P > 0,05$ ). I dati relativi ai parametri valutati sono riportati nella Tabella 1. I parametri produttivi non sono stati influenzati in maniera significativa dal trattamento, come neanche la mortalità totale nei primi cinque giorni di vita dei suinetti. Le due più comuni cause di mortalità fra i suinetti in entrambi i gruppi di trattamento si sono dimostrate lo schiacciamento e l'inedia. Tuttavia, il gruppo trattato con D-cloprostenolo ha mostrato una percentuale inferiore di suinetti schiacciati ( $2,15 \pm 4,77$  vs  $5,12 \pm 13,78$ ;  $P < 0,001$ ), ma una più alta percentuale di suinetti morti per inedia ( $2,25 \pm 3,87$  vs  $1,01 \pm 8,65$ ;  $P = 0,029$ ). Le percentuali più elevate di mortalità si sono verificate nei primi due giorni di vita dei suinetti, con una tendenza alla diminuzione verso il quinto giorno. La percentuale di mortalità dovuta allo schiacciamento e all'inedia entro i primi cinque giorni di vita è rappresentata in Figura 1. Differenze statistiche tra i due gruppi trattati si sono verificate per quanto riguarda l'imbrattamento cutaneo da meconio. A questo riguardo, i suinetti appartenenti al gruppo di trattamento con D-cloprostenolo, hanno mostrato una frequenza più elevata di punteggio 0 (assenza di meconio sulla cute) rispetto al gruppo trattato con alfaprostolo ( $65,4\%$  vs  $57,4\%$ , rispettivamente:  $P < 0,001$ ). In particolare, i suinetti ai quali è stato assegnato punteggio 2 erano pari al 6,25% nel gruppo trattato con D-cloprostenolo rispetto al 12,07% nel gruppo trattato con alfaprostolo ( $P < 0,001$ ; Figura 2).

I risultati ottenuti in questo studio son in accordo con quanto già riportato in letteratura, confermando che l'alfaprostolo e il D-cloprostenolo somministrati alla scrofa 24 ore prima della data prevista del parto sono molecole efficaci nell'induzione del parto. L'efficienza induttiva di entrambe le molecole è stata anche superiore rispetto ai dati riportati da precedenti autori: Straw et al. (12), ad esempio, avevano ottenuto una media di parti avvenuti in un orario lavorativo molto simile a quello considerato nel presente lavoro (dalle ore 07.00 alle ore 15.00) che era compresa tra il 52,3% e il 60,1% delle scrofe trattate con prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$ . Mediamente, comunque, la percentuale di scrofe sottoposte a protocollo induttivo che partoriscono il giorno lavorativo seguente varia da circa il 40% fino a superare il 90% (8), in accordo con i presenti risultati. Nello specifico, solo una piccola percentuale di scrofe coinvolte nello studio non ha prontamente risposto al protocollo induttivo e quindi ha iniziato il parto dopo le 15:30, senza alcuna differenza tra trattamenti (7,1% per il gruppo D-cloprostenolo e l'8,0% nel gruppo alfaprostolo).

Le più comuni cause di mortalità fra i suinetti in entrambi i gruppi di trattamento, si sono dimostrate lo schiacciamento e l'inedia. Come per la natimortalità, anche l'analisi delle perdite legate al primo giorno di vita sembra essere influenzata dal fattore "assistenza". Sempre Alonso-Spilsbury et al. (1) sottolineano infatti che il ruolo dell'operatore in sala parto non si limita alle esplorazioni uterine, ma comprende anche la cura del neonato nelle prime ore di vita. Fondamentali sono l'assistenza ai suinetti deboli e ai sottopeso, lo svuotamento delle vie aeree negli animali che nascono con insufficiente vitalità, la somministrazione del colostro a quelli che non raggiungono il capezzolo, il salvataggio degli animali schiacciati e il riscaldamento aggiuntivo con lampade e materiale assorbente per gli animali in difficoltà. A conferma dei dati riportati in bibliografia, le percentuali più elevate di mortalità si sono verificate nei primi due giorni di vita dei suinetti, con una tendenza alla diminuzione verso il quinto giorno. Globalmente, il gruppo trattato con D-cloprostenolo ha mostrato una percentuale inferiore di suinetti schiacciati ( $2,15 \pm 4,77$  vs alfaprostolo  $5,12 \pm 13,78$ ), ma una più alta percentuale di suinetti morti per inedia ( $2,25 \pm 3,87$  vs alfaprostolo  $1,01 \pm 8,65$ ). La mortalità da schiacciamento è solitamente associata al nervosismo della scrofa che, disturbata da fattori interni o esterni al parto, si alza e si sdraia frequentemente moltiplicando il rischio di schiacciare i suinetti. Sarebbe dunque che il trattamento con D-cloprostenolo possa aver limitato il nervosismo della scrofa che durante il parto può risentire della dolorabilità alle contrazioni provocate dal trattamento induttivo. A sostegno della teoria, anche minori segni di sofferenza fetale rilevati nel neonato. L'imbrattamento da meconio è considerato indice di asfissia del suinetto durante il parto, provocata da distocie o contrazioni molto vigorose della madre.

Nel gruppo D-cloprostenolo si è verificata una maggiore frequenza di morti per inedia nei primi giorni di vita. Tra le cause dell'inedia, la mancata assunzione di colostro e l'impossibilità di una corretta termoregolazione (1). Purtroppo non è possibile evincere dai dati raccolti se tale mortalità possa essere legata, ad esempio, a una minore produzione di colostro e latte da parte della scrofa a causa della sindrome da disgalassia post-partum (8), la cui insorgenza si verifica solitamente entro i primi tre giorni dal parto (10; 7). Vanno dunque presi in considerazione anche i risultati riportati da diversi autori (3; 9; 6) che hanno registrato un aumento della mortalità da inedia nelle nidiate indotte al parto prematuramente. È infatti noto che un parto anticipato, anche solo di poche ore, può determinare una riduzione del peso alla nascita dei suinetti, diminuendo così la loro capacità di termoregolazione a causa delle maggiori perdite di calore corporeo, influenzando così negativamente la loro vitalità e la loro capacità di raggiungere il capezzolo. È tuttavia difficile inquadrare correttamente la problematica rilevata nel gruppo D-cloprostenolo, alla luce dell'identica percentuale di scrofe rispondenti al protocollo induttivo rispetto al gruppo alfaprostolo.

In conclusione, sia alfaprostolo che D-cloprostenolo sono molecole efficaci per indurre il parto nelle scrofe. La sincronizzazione del parto ottenuta ha avuto lo scopo principale di permettere una buona assistenza al parto, che, come è stato dimostrato (Scollo et al., in via di pubblicazione), ha come risultato la riduzione della mortalità durante le prime 24 ore. Emerge comunque l'evidenza che il protocollo induttivo debba sempre essere pianificato correttamente, tenendo conto sia della molecola utilizzata, che del tipo di scrofa che si vuole indurre e che l'assistenza al parto rappresenta il fattore determinante per il miglioramento del rendimento della sala parto. I risultati suggeriscono, con l'uso del D-cloprostenolo, un minore disturbo della scrofa e del suinetto durante le fasi espulsive del parto, ipotesi formulata per la minore frequenza di mortalità da schiacciamento e minori segni di sofferenza fetale.

| Variabili                         | D-cloprostenolo (n = 85) | Alfaprostolo (n = 87) | Totale         | P-value |
|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|---------|
| <b>Parametri produttivi</b>       |                          |                       |                |         |
| Nati totali (n)                   | 12.3 ± 3.12              | 12.0 ± 3.83           | 12.2 ± 3.49    | Ns      |
| Nati vivi (n)                     | 11.5 ± 3.28              | 11.3 ± 3.78           | 11.4 ± 3.53    | Ns      |
| Nati morti (%)                    | 5.7 ± 9.41               | 6.5 ± 10.6            | 6.1 ± 10.0     | Ns      |
| Mummificati (%)                   | 5.1 ± 9.19               | 6.6 ± 14.93           | 5.9 ± 12.38    | Ns      |
| Esplorazioni uterine (n)          | 2.5 ± 2.42               | 2.1 ± 2.47            | 2.3 ± 2.45     | Ns      |
| Durata del parto (min)            | 233.2 ± 98.73            | 239.9 ± 108.2         | 236.7 ± 103.40 | Ns      |
| <b>Mortalità e cause di morte</b> |                          |                       |                |         |
| Morsicatura della scrofa (%)      | 0.0                      | 0.0                   | 0.0            | Ns      |
| Schiacciamento (%)                | 2.15 ± 4.77              | 5.12 ± 13.78          | 3.78 ± 10.52   | < 0.001 |
| Inedia (%)                        | 2.25 ± 3.87              | 1.01 ± 8.65           | 1.63 ± 6.03    | 0.029   |
| Diarrea (%)                       | 0.0                      | 0.0                   | 0.0            | Ns      |
| Altro (%)                         | 0.0                      | 0.0                   | 0.0            | Ns      |
| Giorno 1 (%*)                     | 2,26                     | 2,84                  | 2,55           | Ns      |
| Giorno 2 (%*)                     | 1,68                     | 1,88                  | 1,78           | Ns      |
| Giorno 3 (%*)                     | 0,32                     | 1,06                  | 0,69           | Ns      |
| Giorno 4 (%*)                     | 0,21                     | 0,32                  | 0,27           | Ns      |
| Giorno 5 (%*)                     | 0,11                     | 0,22                  | 0,16           | Ns      |
| Mortalità totale 1-5 giorni (%)   | 4.51                     | 6.19                  | 5.35           | Ns      |

Tabella 1. Analisi descrittiva delle variabili (± deviazione standard) per ciascun gruppo di trattamento. \*dato calcolato sui suinetti sopravvissuti Ns: non significativo (P > 0,05)

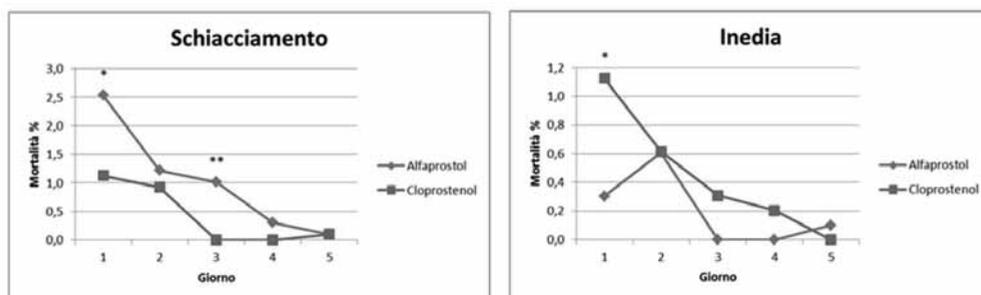


Figura 1. Percentuale di mortalità per inedia e schiacciamento per ciascun gruppo di trattamento. \* P < 0.05 \*\* P < 0.01

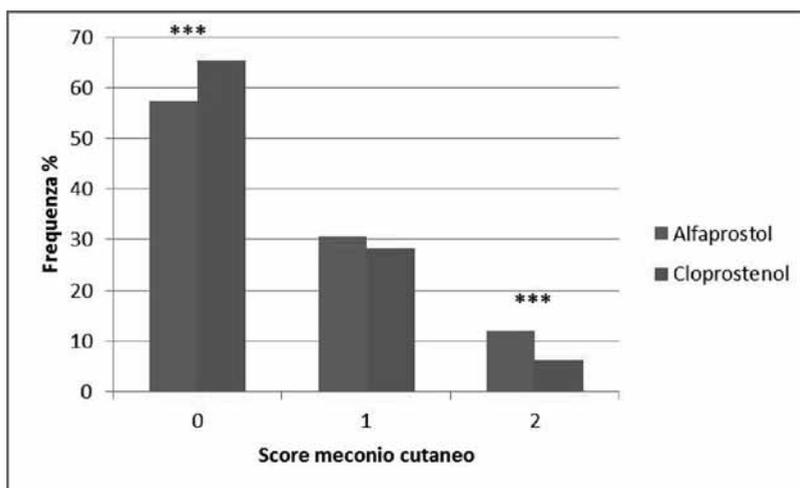


Figura 2. Frequenza di punteggio fecale cutaneo nei suinetti per ciascun gruppo di trattamento. \*\*\*  $P < 0.001$

#### BIBLIOGRAFIA:

1. Alonso-Spilsbury, M., Ramirez-Necoechea, R., González-Lozano, M., Mota-Rojas, D., & Trujillo-Ortega, M. E. (2007). Piglet survival in early lactation: a review. *J. Anim. Vet. Adv*, 6(1), 76-86.
2. Boland, M. P., & Herlihy, M. J. (1982). Induction of parturition in the pig using a new prostaglandin analogue (K11941). *Theriogenology*, 17(2), 193-197.
3. Bosc, M.J., Martinat-Botte, F., Duchène, P., 1975. Induction de la mise bas de la truie par un analogue de la prostaglandine F2: conséquences zootechniques. *Ann. Zootech.* 24, 661-670.
4. Foisnet, A., Farmer, C., David, C., & Quesnel, H. (2011). Farrowing induction induces transient alterations in prolactin concentrations and colostrum composition in primiparous sows. *Journal of animal science*, 89(10), 3048-3059.
5. Gunvaldsen, R. E., Waldner, C., & Harding, J. C. (2007). Effects of farrowing induction on suckling piglet performance. *J. Swine Health Prod*, 15(2), 84-91.
6. Hansen, L.H., 1979. Reproductive efficiency and incidence of MMA after controlled farrowing using a prostaglandin analogue. *Cloprostenol. Nord. Veterinaermed.* 31, 122-128.
7. Jackson, P.G.G., Cockroft, P.D., 2007. *Handbook of Pig Medicine*. Saunders Elsevier, Edinburgh, UK.
8. Kirkden, R. D., Broom, D. M., & Andersen, I. L. (2013). Piglet mortality: the impact of induction of farrowing using prostaglandins and oxytocin. *Animal reproduction science*, 138(1), 14-24.
9. Lynch, P.B., Langley, O.H., 1977. Induced parturition in sows using prostaglandin analogue (ICI 80996). *Ir. J. Agric. Food Res.* 16, 259-265.
10. Martineau, G.-P., Smith, B.B., Doizé, B., 1992. Pathogenesis, prevention, and treatment of lactation insufficiency in sows. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 8 (3), 661-684.
11. Sanchez-Aparicio, P., Mota-Rojas D, D., Trujillo-Ortega, M. E., Zarco-Quintero, L. A., Beceril-Herrera, M., Alonso-Spilsbury, M., & Alfaro-Rodriguez, A. (2009). Effect of prostaglandins for inducing birth on weight, vitality and physiological response in newborn pigs. *Journal of Applied Animal Research*, 36(1), 113-118.
12. Straw, B., Bates, R., & May, G. (2008). Influence of method of administration of prostaglandin on farrowing and relationship between gestation length and piglet performance. *J. Swine Health Prod* 16(3), 138.

# MISCELA DI ESTRATTI NATURALI (ALGATAN MATER®) NELLA DIETA DI SCROFE IN LATTAZIONE: EFFETTI SU PERFORMANCE DI SCROFE E SUINETTI

ROSSI R.<sup>[1]</sup>, MAGHIN F.<sup>[1]</sup>, TUCCI T.<sup>[2]</sup>, CORINO C.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (VESPA) ~ Via Celoria 10, 20133 Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Medico Veterinario, Libero Professionista ~ Mantova ~ Italy

Keywords: natural extracts, livestock performance, lactating sow

## **Riassunto**

L'attuale tendenza verso un minor impiego di antibiotici, ha orientato la ricerca scientifica verso lo studio di sostanze naturali in grado di migliorare le performance e il benessere animale. Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare i parametri produttivi di scrofe in lattazione la cui dieta è stata integrata con Algatan Mater®. Nella prova sono state utilizzate 84 scrofe (42 per banda), suddivise in due gruppi: controllo e Algatan Mater®. Nelle scrofe sono stati registrati i consumi alimentari, lo spessore del grasso dorsale all'entrata in sala parto e a 21 giorni di lattazione, e i dati riproduttivi del ciclo successivo. Ogni nidiata è stata pesata al parto, al pareggiamento e a 21 giorni di lattazione. I risultati mostrano che lo spessore del grasso dorsale in P2 tende ad esser inferiore ( $P=0.07$ ) nelle scrofe alimentate con Algatan Mater® rispetto al controllo. La somministrazione di Algatan Mater® alle scrofe ha migliorato ( $P<0.05$ ) l'accrescimento medio giornaliero ed il peso dei suinetti a 21 giorni di vita ( $P=0.014$ ). Inoltre, si è evidenziato un aumento del numero dei nati totali al parto successivo nel gruppo trattato ( $P=0.04$ ) rispetto al controllo. I risultati suggeriscono che l'inclusione nella dieta delle scrofe in lattazione di Algatan Mater® porta ad un miglioramento delle performance di scrofe e suinetti.

## **Abstract**

The actual tendency to decrease the use of antibiotic has promoted the scientific research towards the identification and study of natural substances able to improve animal performance and welfare. The aim of the study was to investigate the reproductive data of lactating sows fed with Algatan Mater® and evaluate the litters' performance from birth to 21 days of lactation. Eighty-four sows (42 per batch) were divided in two groups fed a control and Algatan Mater® supplemented diet. Feed intake, backfat at entry in farrowing room and at 21 days of lactation, and sows' reproductive data until the next service were collected. Weight at birth, after cross-fostering and at 21 days of lactation were recorded to each litter. The data showed that the backfat loss tended to be lower ( $P=0.07$ ) in sows fed Algatan Mater® than control. The administration of Algatan Mater® in sows improved ( $P<0.05$ ) the piglets average daily gain and body weight at 21 days of lactation ( $P=0.014$ ). Furthermore, the total number of piglets born at the next farrowing from treated group was higher ( $P=0.04$ ) than control group. The results suggest that the inclusion in lactating sows of Algatan Mater® improves lactating sows and piglets performance.

## **INTRODUZIONE:**

La filiera suinicola rappresenta una delle componenti principali del sistema agro-alimentare nazionale. Negli ultimi anni si è assistito a crisi ricorrenti del settore dovute

alla contingente situazione economica, con conseguente riduzione del numero di allevamenti. La crescita dei costi di produzione, la crisi dei consumi e l'adeguamento alla legislazione comunitaria sul benessere animale (Direttiva 2008/120/Ce) hanno portato ad un decremento del numero di soggetti, in particolare del parco scrofe (-19% dal 2010; dati IPQ, 2014). Per mantenere un competitivo numero di suinetti svezzati/scrofa/anno ci si è orientati verso l'utilizzo di genetiche iperprolifiche, aumentando nel contempo il numero di suinetti con basso peso. In questa situazione diventa indispensabile impiegare tecniche di alimentazione il più efficienti possibili per migliorare ulteriormente le performance. Considerato che, l'Unione Europea ha bandito dal 2006 l'uso di antibiotici per scopi auxinici (Regolamento 1831/2003/EC), l'interesse scientifico si è focalizzato sulla possibilità di utilizzare sostanze naturali, per sostenere le produzioni e migliorare lo stato di salute dell'animale. Recenti studi hanno infatti evidenziato come l'utilizzo di estratti vegetali abbia un effetto positivo su sistema immunitario e status antiossidante (5,6). Inoltre, una modulazione positiva del microbiota intestinale risulta una strategia efficace per un miglior utilizzo dei nutrienti da parte dell'animale con un effetto positivo sulle performance di crescita (17). I polifenoli, un gruppo molto eterogeneo di metaboliti secondari prodotti dai vegetali, hanno riscontrato notevole interesse per l'azione antibatterica (3), antidiarroica (16) ed antiossidante (14). Inoltre, gli estratti di alghe hanno catturato l'attenzione per l'elevato contenuto in composti caratterizzati da attività antimicrobiche, antiossidanti, anti-infiammatorie ed immunomodulanti (1, 10). In particolare, si evidenzia un elevato contenuto di molecole bioattive quali: polisaccaridi solforati, diterpeni, fluorotannini, acidi grassi omega 3, minerali e vitamine (20). I polisaccaridi solforati, laminarina e fucoidani, hanno un'azione prebiotica con effetto positivo sul benessere del tratto gastroenterico (15). Tali composti presentano inoltre uno spiccato effetto antibatterico verso i Gram positivi e Gram negativi quali l'*Escherichia Coli* spp (8, 13). Un recente studio evidenzia come la somministrazione di estratti di alghe ha portato ad un miglioramento dell'efficienza alimentare ed una modulazione della microflora batterica a livello enterico (12). Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare i principali parametri riproduttivi delle scrofe trattate con Algatan Mater® durante la fase di lattazione, e valutare quindi le performance delle nidiate ed i parametri riproduttivi delle scrofe al successivo ciclo riproduttivo.

## **MATERIALI E METODI:**

### **Animali e management**

La prova è stata effettuata in un'azienda suinicola convenzionale sita in provincia di Mantova. Per la prova sperimentale sono state utilizzate 84 scrofe TOPIGS20 suddivise in due bande. Gli animali, omogenei per ordine di parto, sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali: gruppo controllo, alimentato con dieta commerciale e gruppo trattato, alimentato con dieta commerciale integrata con Algatan Mater® (Lombarda Trading S.r.l., Casalbuttano ed Uniti, CR, Italia). Gli animali trattati hanno ricevuto 15 g/giorno di Algatan Mater® dall'entrata in sala parto fino allo svezzamento dei suinetti. Ogni scrofa è stata identificata tramite marca auricolare e relativa scheda per la registrazione individuale dei dati. Il giorno dopo il parto è stato effettuato il pareggiamento delle nidiate, all'interno del trattamento, per uniformare il peso e il numero dei suinetti sotto-scrofa.

### **Rilievi**

Per ciascuna scrofa si è proceduto alla rilevazione dello spessore del grasso dorsale in P2 all'entrata in sala parto e a 21 giorni di lattazione. Tale rilevazione è stata effettuata con apposito strumento ad ultrasuoni Lean-Meater (Renco corporation, USA) posizionato a 6

cm rispettivamente dalla linea mediana a livello dell'ultima costa. Inoltre, per ogni scrofa sono stati rilevati i consumi alimentari. Alla nascita dei suinetti, per ciascuna scrofa sono stati registrati i seguenti parametri: nati totali, nati vivi, nati morti, mummificati, suinetti allattati dopo pareggiamento e suinetti svezzati. Le scrofe sono state monitorate durante il ciclo successivo e sono stati registrati i dati riproduttivi riguardanti: intervallo svezzamento-estro, portata al parto, interparto, nati totali e nati vivi. Su ciascuna nidata è stato rilevato il peso al parto, al pareggiamento e a 21 giorni di lattazione. I dati registrati hanno permesso di calcolare: il consumo di alimento giornaliero delle scrofe, la diminuzione dello spessore del grasso dorsale delle scrofe nell'intervallo parto-21 giorni di lattazione, il tasso di mortalità dei suinetti %, il peso medio e l'incremento medio giornaliero dei suinetti.

#### Analisi statistica

I dati sono stati sottoposti ad analisi statistica mediante programma statistico SPSS (SPSS/PC Statistics 22.0 SPSS Inc., Chicago, IL) mantenendo come effetti fissi il trattamento alimentare e le bande. I dati sono stati quindi analizzati con una ANOVA a due vie, valutando l'effetto dei fattori fissi e la loro interazione. I dati riproduttivi relativi al parto successivo delle scrofe, dopo effettuazione del test di normalità di Shapiro-Wilk, sono stati analizzati con un'analisi non parametrica considerando il trattamento come variabile di raggruppamento.

#### **RISULTATI E DISCUSSIONE:**

I dati relativi alle performance produttive delle scrofe in relazione al trattamento alimentare ed alla banda sono riportati in Tabella 1. Non si evidenziano differenze significative ( $P>0.05$ ) per quanto riguarda l'ordine di parto tra scrofe che hanno ricevuto l'integrazione con Algatan Mater<sup>®</sup> e gruppo controllo, mentre si evidenzia una differenza significativa tra bande, con ordine di parto inferiore nella prima banda rispetto alla seconda. La banda inoltre influenza in modo significativo il numero e peso dei suinetti a 21 giorni di lattazione, risultando quindi superiori nella seconda banda rispetto alla prima. Si rilevano differenze significative ( $P>0.05$ ) relative all'interazione tra trattamento alimentare e banda, evidenziando come i dati raccolti non siano influenzati dalla ripetizione effettuata nelle due prove in campo.

Le scrofe alimentate con Algatan Mater<sup>®</sup> mostrano una diminuzione dello spessore del grasso dorsale nell'intervallo dal parto a 21 giorni di lattazione tendenzialmente minore ( $P=0.070$ ) rispetto al gruppo controllo. Tale dato indica un inferiore tasso di mobilitazione delle riserve corporee durante l'allattamento. Risultati simili sono stati evidenziati da Matysiak et al. (11), che riportano una minor diminuzione dello spessore del grasso dorsale in scrofe alimentate con una miscela di estratti naturali durante la lattazione.

Non si evidenziano differenze significative ( $P>0.05$ ) tra i due gruppi per quanto riguarda il numero di nati totali, vivi, morti e mummificati, né per quanto riguarda il peso medio della nidata.

|                                       | Controllo | Algatan Mater® | I banda | II banda | Pooled SEM | Tratt        | Banda            | Tratt*Banda |
|---------------------------------------|-----------|----------------|---------|----------|------------|--------------|------------------|-------------|
| <b>No. scrofe</b>                     | 42        | 42             | 42      | 42       |            |              |                  |             |
| <b>Ordine di parto</b>                | 3.80      | 4.50           | 3.44    | 4.92     | 0.23       | 0.132        | <b>0.001</b>     | 0.859       |
| <b>Spessore grasso dorsale P2(mm)</b> |           |                |         |          |            |              |                  |             |
| - ingresso                            | 21.72     | 19.95          | 20.46   | 21.36    | 0.60       | 0.137        | 0.454            | 0.550       |
| - a 21 giorni                         | 16.16     | 15.73          | 15.58   | 16.39    | 0.47       | 0.634        | 0.376            | 0.156       |
| <b>Variazione P2, mm</b>              | (-)5.51   | (-)4.41        | (-)5.02 | (-)4.97  | 0.32       | 0.070        | 0.938            | 0.332       |
| <b>N° suinetti</b>                    |           |                |         |          |            |              |                  |             |
| - nati totali                         | 14.82     | 14.55          | 14.56   | 14.85    | 0.32       | 0.695        | 0.672            | 0.092       |
| - nati morti                          | 0.95      | 0,73           | 0.75    | 0.95     | 0.14       | 0.407        | 0.471            | 0.127       |
| - mummificati                         | 0.55      | 0.53           | 0.49    | 0.59     | 0.12       | 0.932        | 0.675            | 0.112       |
| - nati vivi                           | 13.14     | 13.3           | 13.1    | 13.31    | 0.34       | 0.807        | 0.795            | 0.808       |
| - al pareggiamento                    | 12.66     | 12.53          | 12.38   | 12.85    | 0.79       | 0.381        | <b>0.002</b>     | 0.963       |
| - a 21 giorni                         | 11.50     | 11.15          | 11.02   | 11.69    | 0.11       | 0.100        | <b>&lt;0.001</b> | 0.206       |
| <b>Peso nidiata (kg)</b>              |           |                |         |          |            |              |                  |             |
| - nascita,                            | 17.93     | 18.28          | 17,88   | 18.34    | 0.51       | 0.724        | 0.649            | 0.570       |
| - pareggiamento                       | 17.61     | 17.84          | 17.30   | 18.19    | 0.33       | 0.708        | 0.160            | 0.184       |
| - a 21 giorni                         | 62.00     | 64.49          | 60.60   | 66.17    | 1.16       | 0.260        | <b>0.010</b>     | 0.494       |
| <b>Peso suinetto (kg)</b>             |           |                |         |          |            |              |                  |             |
| - nascita,                            | 1.37      | 1.39           | 1.36    | 1.39     | 0.02       | 0.656        | 0.525            | 0.115       |
| - pareggiamento                       | 1.39      | 1.42           | 1.40    | 1.42     | 0.02       | 0.438        | 0.693            | 0.122       |
| - a 21 giorni                         | 5.38      | 5.80           | 5.55    | 5.66     | 0.09       | <b>0.014</b> | 0.388            | 0.865       |
| <b>Mortalità (%)</b>                  | 9.04      | 10.86          | 10.85   | 8.82     | 0.84       | 0.261        | 0.209            | 0.255       |

Tabella 1. Performance produttive in relazione al trattamento alimentare e alla banda.

Si è osservato che i suinetti nati da scrofe trattate hanno avuto un aumento significativo ( $P=0.014$ ) del peso medio a 21 giorni di lattazione e un miglior incremento medio giornaliero (IMG) rispetto al gruppo controllo ( $216.95 \pm 6.09$  g/giorno e  $197.88 \pm 5.22$  g/giorno rispettivamente;  $P=0.019$ ; Figura 1). La somministrazione di Algatan Mater® nella dieta della scrofa ha migliorato le performance di crescita dei suinetti, in accordo con studi che dimostrano come l'integrazione alimentare con polifenoli sia in grado di migliorare le performance dei suinetti sottoscrofa (2,7).

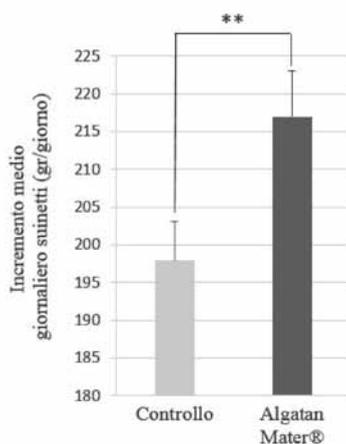


Figura 1. Incremento medio giornaliero dei suinetti durante l'allattamento nel gruppo controllo e del gruppo alimentato con Algatan Mater®.

Il maggiore peso dei suinetti a 21 giorni di vita suggerisce che scrofe trattate con estratti naturali abbiamo una miglior produzione latte, per una miglior efficienza di assorbimento dei nutrienti da parte delle scrofe, in assenza di differenze legate all'assunzione alimentare tra gruppo controllo e trattato ( $3.92 \pm 0.15$  kg/giorno e  $3.99 \pm 0.15$  kg/giorno rispettivamente;  $P=0.733$ ). L'assorbimento dei nutrienti a livello enterico, così come l'immunità locale richiedono un equilibrio ottimale della microflora intestinale (19). Ipotesi di una miglior efficienza di assorbimento dei nutrienti potrebbe essere dovuto alla presenza di laminarina e fucoidani, che agiscono come prebiotici con un beneficio sulla salute dell'ospite (21) oltre all'azione antibatterica dei polifenoli (4). In particolare, laminarina e fucoidani sono in grado di modulare indirettamente la salute dell'intestino, stimolando la produzione microbica di acidi grassi a corta catena, quali l'acido butirrico (9). Tale acido grasso risulta avere un effetto stimolante diretto sulla proliferazione degli enterociti, essendo utilizzato come fonte energetica preferenziale (18).

I dati riproduttivi delle scrofe al parto successivo sono riportati in Tabella 2.

| <b>Parametri</b>                      | <b>Controllo</b> | <b>Algatan Mater®</b> | <b>P-value</b> |
|---------------------------------------|------------------|-----------------------|----------------|
| <b>Svezzamento-estro <sup>a</sup></b> | 4.40 ± 0.084     | 4.43 ± 0.103          | 1.000          |
| <b>Fertilità <sup>a</sup></b>         | 0.90 ± 0.048     | 0.95 ± 0.036          | 0.675          |
| <b>Portata al parto <sup>a</sup></b>  | 0.88 ± 0.053     | 0.95 ± 0.036          | 0.432          |
| <b>Interparto <sup>b</sup></b>        | 148.4 ± 1.00     | 148.1 ± 0.71          | 0.473          |
| <b>Nati totali <sup>b</sup></b>       | 14.43 ± 0.35     | 15.46 ± 0.54          | <b>0.044</b>   |
| <b>Nati vivi <sup>b</sup></b>         | 12.80 ± 0.34     | 13.60 ± 0.47          | 0.182          |

Tabella 2. Dati riproduttivi delle scrofe al parto successivo; a, N=40, controllo; N=39, Algatan Mater®; b, N=35, controllo; N=37, Algatan Mater®

Non si rilevano differenze significative ( $P>0.05$ ) tra gruppo controllo e trattato per quanto riguarda l'intervallo svezzamento-calore, la fertilità, la portata al parto, l'intervallo interparto ed i nati vivi. Per quanto riguarda i nati totali da scrofe trattate con Algatan Mater® è stata osservata una differenza statisticamente significativa ( $P=0.044$ ) rispetto al gruppo controllo. Tale risultato suggerisce un effetto del trattamento alimentare sul tasso di ovulazione e/o sulla sopravvivenza embrionale. In particolare il primo fenomeno potrebbe derivare dal bilancio energetico più favorevole, come evidenziato da un minore tasso di mobilizzazione delle riserve corporee.

Nella presente ricerca i dati relativi alla minor mobilizzazione di riserve corporee nelle scrofe e il maggior peso dei suinetti indicano come l'integrazione alimentare con Algatan Mater® risulta essere una nuova strategia alimentare per le scrofe in fase di allattamento.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. Bahar B., O'Doherty J.V., Hayes M., and Sweeney T. (2012) Extracts of brown seaweeds can attenuate the bacterial lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory response in the porcine colon ex vivo. *J Anim Sci.* 90 (4): 46–48.
2. Chengquan T., Wei H., Sun H., Ao J., Long G., Jiang S., and Peng J. (2015) Effects of Dietary Supplementation of Oregano Essential Oil to Sows on Oxidative Stress Status, Lactation Feed Intake of Sows, and Piglet Performance. *Biomed Res Int.* Article ID 525218.
3. Cowan M.M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 12: 564–582.

4. Daglia M. (2012) Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol.* 23(2): 174–181.
5. Franz C., Baserb K.H.C., and Windische W. (2010) Essential oils and aromatic plants in animal feeding – a European perspective. A review. *Flavour Fragr J.* 25: 327–340.
6. Hashemi S.R., and Davoodi, H. (2011) Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Vet Res Commun.* 35: 169–180.
7. Ilsley S.E., Miller H.M., Greathead H.M.R., and Kamel C. (2003) Plant extracts as supplements for lactating sows: effects on piglet performance sow food intake and diet digestibility. *Anim Sci.* 77: 247–254.
8. Kamenarska Z., Julia S., Hristo N., Kamen S., Iva T., Stefka D.K., et al. (2009) Antibacterial, antiviral, and cytotoxic activities of some red and brown seaweeds from the Black Sea. *Bot Mar.* 52(1): 80–86.
9. Lynch M.B., Sweeney T., Callan J.J., O’Sullivan J.T., and O’Doherty J.V. (2010) The effect of dietary Laminaria derived laminarin and fucoidan on intestinal microflora and volatile fatty acid concentration in pigs. *J Sci Food Agr.* 90(3): 430–437.
10. Maghin F., Ratti S., and Corino C. (2014). Biological functions and health promoting effects of brown seaweeds in swine nutrition. *J Dairy Vet Anim Res.* 1(1): 00005.
11. Matysiak B., Jacyno E., Kawecka M., Kołodziej-Skalska A., and Pietruszka A. (2012) The effect of plant extracts fed before farrowing and during lactation on sow and piglet performance. *S Afr J Anim Sci.* 42 (1): 15–21.
12. McAlpine P., O’Shea C.J., Varley P.F., Flynn B., and O’Doherty J.V. (2012) The effect of seaweed extract as an alternative to zinc oxide diets on growth performance, nutrient digestibility, and fecal score of weaned piglets. *J Anim Sci.* 90(4): 224–226.
13. Mukhopadhyaya A., O’Doherty J.V., Smith A., Bahar B., and Sweeney T. (2012) The microbiological and immunomodulatory effects of spray-dried versus wet dietary supplementation of seaweed extract in the pig gastrointestinal tract. *J Anim Sci.* 90(4): 28–30.
14. Nićiforovića N., Mihailovića V., Maškovića P., Solujića S., Stojkovića A., and Pavlović Muratspahić D. (2010) Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. *Food Chem Toxicol.* 48(11): 3125–3130.
15. O’Doherty J.V., McDonnell P., Figat S. (2010) The effect of dietary laminarin and fucoidan in the diet of the weanling piglet on performance and selected faecal microbial populations. *Livest Sci.* 134(1-3): 208–210.
16. Palombo E.A. (2006) Phytochemicals from traditional medicinal plants used in the treatment of diarrhoea: Modes of action and effects on intestinal function. *Phytother Res.* 20: 717–724.
17. Richards J.D., Gong J., and de Lange C.F.M. (2005) The gastrointestinal microbiota and its role in monogastric nutrition and health with an emphasis on pigs: Current understanding, possible modulations, and new technologies for ecological studies. *Can J Anim Sci.* 85: 421–435.
18. Rossi R., Pastorelli G., Cannata S., and Corino C. (2010) Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets: A review. *Anim Feed Sci Technol.* 162(1-2): 1–11.
19. Sekirov I., Russell S. L., Antunes L. C., and Finlay B.B. (2010) Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev.* 90: 859–904.
20. Suhaila M., Siti N.H., Hafeedza A.R. (2012) Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Tech.* 23(2): 83–96.
21. Vidanarachchi J.K., Iji P.A., Mikkelsen L.L., Sims I., and Choct M. (2009) Isolation and characterization of water-soluble prebiotic compounds from Australian and New Zealand plants. *Carbohydr Polymers.* 77(3): 670–676.





**PREMIO GUADAGNINI 2016**



# MIGLIORAMENTO DELLA QUALITÀ DELLA MAMMELLA NELLA SCROFA AL FINE DI IMPLEMENTARE LA SOPRAVVIVENZA E LE PERFORMANCE DEI SUINETTI

BALZANI A.<sup>1</sup>, CORDELL H. J. †, EDWARDS S. A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*School of Agriculture, Food and Rural Development, Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE1 7RU, UK; † Institute of Genetic Medicine, Newcastle University, Newcastle upon Tyne NE1 3BZ, UK*

**Parole chiave:** morfologia della mammella, qualità del colostro, scrofa.

**Key words:** colostrum quality, sow, udder morphology.

## Riassunto

La sopravvivenza e la crescita del suinetto sono determinate dalla sua capacità di assumere colostro rapidamente dopo la nascita, ciò può essere influenzato dalla morfologia della mammella. Pertanto gli obiettivi dello studio sono stati: definire una metodologia per descrivere i tratti della mammella (1), definire i fattori di variazione morfologica (2) e determinare la relazione tra la morfologia e la scelta della mammella da parte del suinetto (3). Un altro obiettivo è stato quello di valutare la qualità del colostro (IgG) utilizzando un metodo rapido in azienda (4), ed infine applicare i risultati ottenuti per valutare l'ereditarietà ( $h^2$ ) dei tratti della mammella e della qualità del colostro (5). Lo studio sull'allattamento del neonato ha mostrato che la vitalità e il peso alla nascita non hanno influenzato la scelta della mammella o la latenza dalla nascita alla prima suzione. La maggior parte dei suinetti nella stessa nidiata ha assunto colostro per la prima volta dalla stessa mammella, localizzata per lo più nella parte posteriore del corpo. Inoltre è stata testata la qualità del colostro utilizzando un refrattometro. La percentuale Brix ottenuta con il refrattometro ha mostrato una correlazione positiva con i risultati ottenuti in laboratorio utilizzando una tecnica di immunodiffusione. Tutte le caratteristiche morfologiche della mammella e la qualità del colostro misurati in questo studio hanno media-elevata ereditabilità, ed alcune importanti correlazioni con caratteristiche riproduttive e produttive della scrofa. Pertanto questi tratti dovrebbero essere inclusi tra gli obiettivi di selezione per migliorare il progresso genetico del suino.

## Abstract

Survival and growth of the piglet is determined by its ability to suckle rapidly after birth, which can be influenced by sow udder morphology. The initial aims of this research were to define a methodology to describe udder morphology (1), to study the sources of variation in the morphology (2) and its relationship with piglet teat preferences (3). A further aim was to assess colostrum quality (IgG) using a quick on-farm method (4), and the final objective was to estimate the heritability ( $h^2$ ) of udder morphology and colostrum traits (5). A methodology to describe a sow udder was developed from review of udder morphology. This methodology was then applied show that sow parity number, breed, and teat pair position were significant sources of variation. A study on newborn piglet suckling behaviour showed that piglet characteristics such as vitality score and birth weight did not affect teat preference or the latency from birth to first suckling. The majority of siblings suckled for the first time from a previously used teat, mostly located in the posterior part of the udder. An on-farm methodology was evaluated for assessment of colostrum Immunoglobulin G content. The brix refractometer percentage

showed a positive correlation with laboratory Radial immunodiffusion results. All udder morphology and colostrum traits measured in this study were moderate to highly heritable, with some important correlations with reproductive and productive traits. These udder traits should be included in the breeding goal and weighed appropriately with other important traits in the breeding objectives to enhance optimal genetic progress.

## **INTRODUZIONE**

La mortalità dei suinetti è una delle principali fonti di perdita finanziaria per il settore suinicolo. Le cause sono numerose e attualmente circa 1,5 milioni di suinetti nati vivi ogni anno non sopravvivono fino allo svezzamento. Massimizzare il numero di suinetti allevati per scrofa l'anno è uno degli obiettivi principali del settore suinicolo. Dal momento che i costi generali di gestione della scrofa non variano sostanzialmente con le dimensioni della nidiata, più suinetti si allevano maggiore è l'efficienza biologica e finanziaria dell'azienda, e più basso l'impatto ambientale della produzione di carne di suino [1]. Tuttavia l'aumento della prolificità della scrofa che si è verificato negli ultimi decenni, grazie all'attuazione di strategie di selezione genetica specializzate in damlines, ha un impatto negativo sulla sopravvivenza dei suinetti.

Le mammelle sono specializzate nella produzione lattea, il loro massimo sviluppo si ha alla fine della gravidanza. Nella scrofa la funzione mammaria completa quella dell'apparato genitale, perché la placenta non permette il passaggio delle immunoglobuline che avviene mediante l'assunzione del colostro. La salute e le performance del suinetto sono determinate dall'acquisizione dell'immunità passiva entro le prime 24 ore di vita. Questo è un importante fattore che contribuisce ad elevare lo stato di salute del patrimonio suinicolo. È stato dimostrato che il tempo impiegato per trovare il capezzolo e poppare dopo la nascita è un fattore determinante per la sopravvivenza del suinetto [2] e che un ritardo nella suzione riduce sia il livello di immunità passiva [3] sia il conseguente aumento di peso del suinetto [4]. Alla luce di queste considerazioni, lo sviluppo di strategie per migliorare l'accesso alla mammella e ad un'adeguata assunzione di colostro, avrà un impatto positivo sulle prestazioni dei suinetti e sulla loro sopravvivenza. Molti anni fa uno studio condotto da English, Hammond [5] ha evidenziato il problema delle scrofe che non espongono in modo adeguato una parte della fila inferiore della mammella durante l'allattamento. Più recentemente è stato dimostrato che l'accessibilità alla mammella diminuisce con l'aumento del numero dei parti [4]. La necessità di indagare il legame tra la morfologia della mammella e l'accesso al capezzolo, e determinare come i tratti morfologici della mammella variano tra gli animali e come cambiano durante il ciclo di vita della scrofa, è fondamentale al fine di comprendere e mitigare gli effetti della selezione attuata per aumentare le dimensioni della nidiata, la crescita veloce e la percentuale di carne magra [4].

Gli ultimi trenta anni hanno visto sempre più rapidi progressi nel campo della selezione genetica dei suini, Rydhmer [6] ha esaminato i criteri di selezione scrofa e ha dichiarato che l'attuale aumento del numero di suinetti nati deve essere accompagnato dal miglioramento delle capacità materne, al fine di aumentare la produzione e il benessere generale. I criteri di selezione considerati benefici per la produzione e il benessere sono spesso simili in tutte le specie di allevamento, anche se i tratti di maggior valore variano in funzione della destinazione d'uso dell'animale e della specie in questione. È stato stabilito che alcune caratteristiche della mammella in bovini da latte sono controllati da entrambi i fattori genetici e ambientali [7]. Nella produzione di suini, la morfologia della mammella non ha ricevuto la stessa attenzione, nonostante il suo ruolo fondamentale nella cura dei suinetti. Ad oggi, solo il numero di mammelle [8-10] e la funzionalità

del capezzolo sono criteri di selezione compresi nei programmi di selezione dei suini. L'ereditabilità della morfologia delle mammelle e la loro correlazione con importanti criteri di selezione per la produzione (ad esempio, il tasso di crescita, spessore del grasso) e la riproduzione (ad esempio la lunghezza della gestazione, numero dei nati) non sono mai state oggetto di valutazione genetica. L'obiettivo di questo lavoro è stato quindi valutare l'ereditabilità della morfologia della mammella, la qualità del colostro e la loro correlazione con altri tratti di produzione e riproduzione.

## MATERIALI E METODI

**Animali.** Lo studio è stato approvato da Newcastle University Animal Welfare and Ethical Review Body ed è stata effettuata presso l'allevamento ACMC (Beeford, Regno Unito) dal luglio 2014 al febbraio 2015. La popolazione presa in esame è stata di 988 scrofe appartenenti alla razza Meidam (MDM; cross breed Large White X Meishan). Gli animali sono stati trasferiti dall'unità di gestazione all'unità parto a 110 giorni post-inseminazione, dove sono stati allocati in gabbie singole dotate di un alimentatore e bevitore. La temperatura ambiente in sala parto era in media di 21 ° C. Non sono stati applicati interventi specifici nello studio; l'alimentazione, l'ambiente e la gestione sono stati mantenuti standard.

**Tratti morfologici della mammella.** Il numero totale di mammelle presenti in entrambe le linee (TT), la lunghezza del capezzolo (LEN), il diametro (dia), la distanza tra capezzolo all'interno della stessa linea (Samer) e la distanza del capezzolo dalla linea media addominale (alm) sono stati misurati in millimetri con un righello e un calibro. La metodologia utilizzata per misurare i parametri morfologici è quella descritto da Balzani, Cordell [11], [12]. Per ogni scrofa, sono state anche valutate con dei punteggi lo sviluppo della mammella (punteggio dev 1-3, dove 1 è stata definita la mammella non sviluppata e ghiandole mammarie non definite, 2 la mammella è ben sviluppata, ma le ghiandole mammarie non sono chiaramente distinte e 3 la mammella è ben sviluppata e le ghiandole mammarie sono chiaramente distinte), l'orientamento dei capezzoli (or punteggio 0 o 1, dove 0 è stato definito capezzolo non orientato perpendicolarmente alla ghiandola mammaria e 1 è stato definito capezzolo orientato perpendicolarmente alla ghiandola mammaria) e la percentuale di capezzoli non funzionali (NoFun punteggio 0 capezzolo non funzionale con il canale del latte chiuso, cieco o danneggiato; punteggio 1 indica il capezzolo funzionale). Tutti questi tratti sono stati misurati una sola volta per scrofa, a uno a tre giorni prima del parto, nella linea superiore dei capezzoli mentre la scrofa era in una posizione sdraiata su di un fianco.

**Tratti della nidiata.** Il peso della nidiata è stato registrato (LW0) escluso i suinetti nati morti. Il numero totale di suinetti nati (TB), il numero di nati vivi (NBA) e morti (STB). Cross-fostering è stato consentito durante tutto il periodo di allattamento al fine di garantire il benessere degli animali. Questa pratica è stata applicata molto spesso. Durante i primi dieci giorni dopo il parto, il numero di suinetti morti in ogni nidiata è stato registrato. Il numero totale e il peso della nidiata è stato rimisurato a dieci giorni dal parto (LS10 - LW10), e questo valore è stato corretto per il cross fostering.

**Tratti della scrofa.** Il giorno di osservazione sono state registrati l'età al parto (SAF), il numero di parti, e la durata della gestazione (GLEN). Durante i test sono stati misurati l'accrescimento ponderale giornaliero (ADG) e a 100 kg il grasso dorsale (BFAT).

***Tratti del colostro.*** Campioni di colostro sono stati raccolti quando era liberamente disponibile immediatamente prima o precocemente durante il parto, senza l'uso di ossitocina. Un campione 15 ml di colostro è stato raccolto campionando da tutti i capezzoli ubicati nella fila superiore e, quando possibile senza disturbare la scrofa, anche dai capezzoli della fila inferiore della mammella. Il campione è stato raccolto e conservato in un contenitore sterile (30ml Starlab, Milton Keynes, UK).

***Le analisi al campione di colostro.*** Il rifrattometro Brix (MA871 digitale, obione, La Valette, Francia), è stato utilizzato per stimare il contenuto di immunoglobuline nel colostro (COL), come descritto da Balzani, Cordell [13]. Brevemente, all'inizio di ogni serie di analisi è stato tarato con acqua distillata prima di procedere con l'analisi del campione. Una goccia di colostro ben miscelato è stato poi posto sul prisma del rifrattometro ed è stato registrato il punteggio Brix (%).

***Analisi statistiche.*** Sono state calcolate le correlazioni fenotipiche tra i tratti morfologici della mammella. Il coefficiente di correlazione di Pearson è stato utilizzato e i tratti sono stati calcolati come media aritmetica e la deviazione standard dell'intera mammella per ogni animale. Le correlazioni fenotipiche sono state anche stimate tra le caratteristiche qualitative della mammella e criteri produttivi (ADG, BFAT) e riproduttivi (Glen, TB, NBA, STB, LW0, LS10, LW10). La statistica è stata eseguita utilizzando il software R versione 3.0.2 (2013/09/25). L'analisi genetica di ereditarietà dei caratteri delle mammelle e le correlazioni genetiche con caratteri produttivi e riproduttivi sono stati stimati per gli stessi tratti, come per l'analisi fenotipica.

Per l'analisi genetica, le misurazioni della mammella e caratteristiche riproduttive sono stati aggiustati per gli effetti del numero di parto, il lotto, l'anno, il mese e l'effetto del giorno dell'osservazione (BYM-OD). I caratteri produttivi sono stati adeguati per gli effetti del lotto, l'anno, il mese e l'effetto del giorno del test delle prestazioni (BYM-TEST). La scrofa è stata inclusa come effetto casuale nelle analisi. I parametri genetici sono stati stimati utilizzando modelli animali in VCE e Pest. Le stime della Varianza e covarianza ottenute da queste analisi sono stati usati per stimare l'ereditabilità e le correlazioni genetiche tra i tratti. L'equazione del modello misto utilizzato, è il seguente:  $Y = \mu + \text{BSM-OD} + \text{BSMP-TEST} + A + E$  dove Y è il vettore delle osservazioni di tratti della mammella,  $\mu$  è la media complessiva, BSM-OD è l'effetto fisso del lotto, anno, mese del giorno di osservazione, BSM-TEST è l'effetto fisso del lotto, anno, mese del giorno del test prestazioni, e vettori di effetti casuali consisteva di additivo animale casuale genetici (a) e (e) residui effetti.

## **RISULTATI**

La statistica descrittiva della morfologia delle mammelle, caratteristiche riproduttive e produttive delle scrofe sono riportati nella Tabella 1. Per le caratteristiche di riproduzione femminile, le stime di ereditabilità sono stati piuttosto bassi (0,03-1), mentre ereditabilità stime per caratteri produttivi sono stati moderati. Le stime di ereditabilità per i tratti morfologici delle mammelle sono state da medie a elevate (Tabella 1).

Tabella 1. Statistica descrittiva e le stime di ereditabilità

| Traits                  | N   | Mean  | SD     | Min   | Max    | $h^2 \pm SE$    |
|-------------------------|-----|-------|--------|-------|--------|-----------------|
| <i>Reproduction</i>     |     |       |        |       |        |                 |
| SAF                     | 988 | 738.6 | 338.87 | 315.0 | 1794.0 | -               |
| GLEN                    | 988 | 115.5 | 1.55   | 110   | 125    | $0.01 \pm 0.01$ |
| NBA                     | 988 | 11.7  | 3.11   | 1.0   | 21.0   | $0.06 \pm 0.04$ |
| TB0                     | 988 | 12.5  | 3.16   | 1.0   | 21.0   | $0.06 \pm 0.04$ |
| LW0                     | 988 | 16.7  | 4.42   | 0.87  | 28.96  | $0.11 \pm 0.03$ |
| LS10                    | 715 | 10.9  | 1.68   | 4.0   | 16.0   | $0.05 \pm 0.03$ |
| LW10                    | 607 | 21.49 | 8.84   | 1.0   | 48.0   | $0.11 \pm 0.04$ |
| LiveD                   | 691 | 0.88  | 1.54   | 0.0   | 14.0   | $0.04 \pm 0.02$ |
| STB                     | 987 | 0.8   | 1.21   | 0.0   | 8.0    | $0.03 \pm 0.04$ |
| <i>Udder morphology</i> |     |       |        |       |        |                 |
| col                     | 528 | 25.5  | 3.50   | 15.1  | 35.0   | $0.35 \pm 0.07$ |
| samer                   | 987 | 104.5 | 14.45  | 62.2  | 154.0  | $0.37 \pm 0.06$ |
| samer SD                | 987 | 21.62 | 7.94   | 4.8   | 74.8   | $0.18 \pm 0.03$ |
| len                     | 986 | 16.1  | 3.00   | 7.0   | 31.3   | $0.46 \pm 0.04$ |
| len SD                  | 986 | 2.81  | 2.21   | 0.0   | 11.34  | $0.42 \pm 0.1$  |
| dia                     | 987 | 10.5  | 1.70   | 4.6   | 16.2   | $0.53 \pm 0.02$ |
| dia SD                  | 987 | 1.77  | 1.38   | 0.1   | 9.4    | $0.11 \pm 0.03$ |
| aml                     | 987 | 61.2  | 10.88  | 30.0  | 105.0  | $0.22 \pm 0.04$ |
| aml SD                  | 987 | 17    | 4.95   | 5.0   | 47.8   | $0.19 \pm 0.03$ |
| OR                      | 987 | 0.9   | 0.21   | 0.0   | 1.0    | $0.14 \pm 0.03$ |
| NoFun                   | 987 | 0.04  | 0.05   | 0.0   | 0.4    | $0.22 \pm 0.05$ |
| TT                      | 987 | 15.6  | 1.12   | 12.0  | 19.0   | $0.42 \pm 0.02$ |
| dev                     | 987 | 2.24  | 0.51   | 1.0   | 3.0    | $0.25 \pm 0.04$ |
| <i>Production</i>       |     |       |        |       |        |                 |
| ADG                     | 863 | 448.5 | 169.39 | 45.9  | 755.1  | $0.53 \pm 0.04$ |
| BFAT                    | 732 | 12.1  | 3.79   | 2.3   | 32.7   | $0.51 \pm 0.05$ |

N = number of observations; SD = standard deviation; Min = minimum; Max = maximum;  $h^2$  = heritability; SE = standard error.

### ***Le stime di correlazioni genetiche e fenotipiche***

Le stime di correlazioni genetiche e fenotipiche tra i tratti morfologici della mammella sono presentate nella Tabella 2. Quasi tutti i tratti morfologici della mammella hanno mostrato medio-alte correlazioni genetiche. La più forte correlazione genetica (rg) e fenotipica (rp) è stata trovata tra le dimensioni dei capezzoli (len e dia,  $rg = 0.55$ ,  $rp = 0,62$ ); dia è stato anche altamente correlato con i tratti dimensioni della mammella (samer  $rg = 0,52$ ,  $rp = 0,34$ ; aml  $rg: 0.25$ ,  $rp = 0,23$  e dev  $rg = 0,31$ ,  $rp = 0,29$ ). La concentrazione IgG nel colostro è stata geneticamente correlata con samer ( $rg = 0,54$ ).

Tabella 2. Le stime di correlazioni genetiche (sopra la diagonale) e fenotipiche (sotto la diagonale) tra i tratti della morfologia della mammella (standard error subscript). Le stime significativamente diverse da zero sono riportate in grassetto.

| Morphology Traits <sup>1</sup> | len          | dia                         | aml                         | samer                       | NoFun                        | dev                         | OR                           | TT                           | COL                          |
|--------------------------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| len                            |              | <b>0.55</b> <sub>0.06</sub> | -0.06 <sub>0.06</sub>       | <b>0.21</b> <sub>0.05</sub> | -0.04 <sub>0.11</sub>        | 0.04 <sub>0.09</sub>        | <b>-0.47</b> <sub>0.09</sub> | -0.01 <sub>0.05</sub>        | <b>-0.16</b> <sub>0.06</sub> |
| dia                            | <b>0.62</b>  |                             | <b>0.25</b> <sub>0.12</sub> | <b>0.52</b> <sub>0.06</sub> | <b>-0.21</b> <sub>0.09</sub> | <b>0.31</b> <sub>0.07</sub> | <b>-0.21</b> <sub>0.05</sub> | 0.13 <sub>0.08</sub>         | 0.07 <sub>0.06</sub>         |
| aml                            | <b>0.13</b>  | <b>0.23</b>                 |                             | <b>0.54</b> <sub>0.11</sub> | <b>0.68</b> <sub>0.09</sub>  | 0.29 <sub>0.16</sub>        | 0.13 <sub>0.11</sub>         | -0.08 <sub>0.18</sub>        | 0.15 <sub>0.11</sub>         |
| samer                          | <b>0.24</b>  | <b>0.34</b>                 | <b>0.22</b>                 |                             | -0.04 <sub>0.1</sub>         | 0.12 <sub>0.12</sub>        | -0.09 <sub>0.10</sub>        | <b>-0.74</b> <sub>0.05</sub> | <b>0.41</b> <sub>0.06</sub>  |
| NoFun                          | <b>-0.06</b> | <b>-0.12</b>                | 0.08                        | 0.06                        |                              | <b>0.25</b> <sub>0.1</sub>  | <b>0.17</b> <sub>0.02</sub>  | <b>0.4</b> <sub>0.06</sub>   | -0.12 <sub>0.10</sub>        |
| dev                            | <b>0.21</b>  | <b>0.29</b>                 | <b>0.17</b>                 | <b>0.21</b>                 | -0.01                        |                             | <b>0.48</b> <sub>0.1</sub>   | 0.07 <sub>0.06</sub>         | 0.1 <sub>0.07</sub>          |
| OR                             | <b>-0.22</b> | <b>-0.10</b>                | 0.12                        | -0.06                       | -0.18                        | 0.06                        |                              | <b>-0.42</b> <sub>0.14</sub> | <b>-0.43</b> <sub>0.11</sub> |
| TT                             | <b>-0.07</b> | <b>-0.11</b>                | 0.01                        | <b>-0.48</b>                | 0.01                         | <b>-0.07</b>                | 0.02 <sub>0.12</sub>         |                              | -0.17 <sub>0.12</sub>        |
| COL                            | 0.06         | <b>0.09</b>                 | -0.04                       | 0.04                        | -0.02                        | 0.07                        | <b>-0.14</b>                 | 0.02                         |                              |

Le correlazioni genetiche stimate tra i tratti di riproduzione e i tratti della mammella a sono presentati nella Tabella 3. La distanza tra i capezzoli nella stessa linea mostrato una associazione genetica con quasi tutti i tratti riproduttivi considerati.

Tabella 3. Correlazioni genetiche stimate tra i tratti di riproduzione e i tratti della mammella (standard error subscripts). Le stime significativamente diverse da zero sono riportate in grassetto.

|                     | Morphology Traits           |                              |                              |                              |                              |                              |                             |                              |                              |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                     | len                         | dia                          | aml                          | samer                        | OR                           | NoFun                        | dev                         | TT                           | COL                          |
| Reproduction Traits |                             |                              |                              |                              |                              |                              |                             |                              |                              |
| GLEN                | 0.08 <sub>0.10</sub>        | 0.17 <sub>0.11</sub>         | 0.36 <sub>0.28</sub>         | -0.14 <sub>0.23</sub>        | -0.01 <sub>0.11</sub>        | -0.03 <sub>0.11</sub>        | <b>-0.36</b> <sub>0.1</sub> | <b>0.42</b> <sub>0.16</sub>  | <b>-0.41</b> <sub>0.18</sub> |
| NBA                 | -0.1 <sub>0.15</sub>        | 0.04 <sub>0.04</sub>         | <b>-0.4</b> <sub>0.19</sub>  | <b>0.69</b> <sub>0.08</sub>  | -0.03 <sub>0.24</sub>        | 0.17 <sub>0.15</sub>         | 0.42 <sub>0.34</sub>        | <b>-0.47</b> <sub>0.08</sub> | <b>0.54</b> <sub>0.13</sub>  |
| TB0                 | -0.33 <sub>0.20</sub>       | -0.24 <sub>0.21</sub>        | -0.26 <sub>0.23</sub>        | <b>0.89</b> <sub>0.13</sub>  | -0.37 <sub>0.3</sub>         | -0.3 <sub>0.22</sub>         | 0.13 <sub>0.17</sub>        | <b>-0.46</b> <sub>0.08</sub> | <b>0.55</b> <sub>0.29</sub>  |
| LW0                 | -0.02 <sub>0.09</sub>       | 0.14 <sub>0.16</sub>         | <b>0.69</b> <sub>0.12</sub>  | <b>0.78</b> <sub>0.15</sub>  | 0.10 <sub>0.08</sub>         | 0.09 <sub>0.15</sub>         | 0.04 <sub>0.11</sub>        | <b>-0.7</b> <sub>0.13</sub>  | <b>0.45</b> <sub>0.11</sub>  |
| LS10                | -0.15 <sub>0.1</sub>        | <b>-0.5</b> <sub>0.09</sub>  | <b>0.22</b> <sub>0.11</sub>  | <b>0.38</b> <sub>0.11</sub>  | -0.15 <sub>0.15</sub>        | -0.16 <sub>0.17</sub>        | <b>-0.52</b> <sub>0.1</sub> | -0.03 <sub>0.11</sub>        | -0.2 <sub>0.11</sub>         |
| LW10                | <b>0.58</b> <sub>0.17</sub> | <b>-0.13</b> <sub>0.11</sub> | <b>-0.56</b> <sub>0.15</sub> | <b>-0.37</b> <sub>0.13</sub> | <b>-0.17</b> <sub>0.08</sub> | <b>-0.51</b> <sub>0.13</sub> | 0.16 <sub>0.18</sub>        | <b>0.5</b> <sub>0.24</sub>   | -0.11 <sub>0.11</sub>        |
| STB                 | -0.2 <sub>0.2</sub>         | -0.27 <sub>0.18</sub>        | <b>0.4</b> <sub>0.2</sub>    | <b>-0.48</b> <sub>0.12</sub> | -0.01 <sub>0.27</sub>        | -0.12 <sub>0.22</sub>        | 0.16 <sub>0.25</sub>        | <b>0.52</b> <sub>0.25</sub>  | -0.44 <sub>0.24</sub>        |

In Tabella 4 sono riportate la correlazione fenotipiche stimate tra i tratti della mammella, la qualità del colostro e i tratti riproduttivi. Le correlazioni fenotipiche tra le caratteristiche qualitative della mammella e le caratteristiche riproduttive hanno lo stesso schema delle correlazioni genetiche.

Tabella 4. Correlazione fenotipiche stimate tra i tratti della mammella, la qualità del colostro e i tratti riproduttivi. Le stime significativamente diverse da zero sono riportate in grassetto.

|                     | Morphology Traits |              |             |             |             |       |              |              |             |
|---------------------|-------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------|--------------|--------------|-------------|
|                     | len               | dia          | aml         | samer       | OR          | NoFun | dev          | TT           | COL         |
| Reproduction Traits |                   |              |             |             |             |       |              |              |             |
| SAF                 | <b>0.45</b>       | <b>0.41</b>  | <b>0.17</b> | <b>0.37</b> | <b>0.22</b> | 0.09  | <b>-0.22</b> | <b>-0.07</b> | 0.05        |
| NBA                 | 0.01              | 0.04         | <b>0.12</b> | <b>0.14</b> | 0.07        | 0.03  | 0.03         | 0.00         | <b>0.08</b> |
| TB0                 | 0.03              | 0.05         | <b>0.11</b> | <b>0.16</b> | -0.03       | 0.04  | 0.03         | 0.01         | 0.05        |
| LW0                 | 0.04              | <b>0.07</b>  | <b>0.11</b> | <b>0.17</b> | -0.00       | 0.02  | <b>0.09</b>  | -0.03        | <b>0.09</b> |
| LS10                | <b>-0.09</b>      | <b>-0.12</b> | 0.05        | -0.01       | 0.03        | -0.01 | -0.04        | 0.06         | -0.01       |
| LW10                | -0.04             | <b>-0.14</b> | 0.02        | -0.03       | 0.03        | -0.03 | -0.01        | 0.07         | 0.01        |
| STB                 | 0.04              | 0.02         | -0.01       | 0.05        | <b>0.08</b> | -0.01 | -0.16        | 0.02         | -0.08       |

Le correlazioni genetiche stimate tra i tratti di produzione e le caratteristiche della mammella sono presentati nella Tabella 5, e le correlazioni fenotipiche sono riportate nella Tabella 6. Solo alcuni tratti sono stati riportati significativamente correlati.

Tabella 5. Correlazioni genetiche stimate tra i tratti di produzione e le caratteristiche della mammella (standard error subscripts). Le stime significativamente diverse da zero sono riportate in grassetto.

|                   | Morphology Traits           |                             |                             |                       |                      |                      |                              |                             |                      |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------|
|                   | len                         | dia                         | aml                         | samer                 | OR                   | NoFun                | dev                          | TT                          | COL                  |
| Production Traits |                             |                             |                             |                       |                      |                      |                              |                             |                      |
| ADG               | <b>0.27</b> <sub>0.11</sub> | 0.14 <sub>0.11</sub>        | <b>0.42</b> <sub>0.14</sub> | -0.06 <sub>0.18</sub> | 0.00 <sub>0.01</sub> | 0.01 <sub>0.02</sub> | 0.03 <sub>0.11</sub>         | -0.03 <sub>0.06</sub>       | 0.26 <sub>0.16</sub> |
| BFAT              | -0.02 <sub>0.07</sub>       | <b>0.28</b> <sub>0.08</sub> | 0.15 <sub>0.13</sub>        | -0.13 <sub>0.1</sub>  | 0.00 <sub>0.02</sub> | 0.01 <sub>0.07</sub> | <b>-0.22</b> <sub>0.06</sub> | <b>0.36</b> <sub>0.07</sub> | 0.01 <sub>0.02</sub> |

Tabella 6. Correlazioni fenotipiche stimate tra i tratti di produzione e le caratteristiche della mammella . Le stime significativamente diverse da zero sono riportate in grassetto.

|                                | Morphology Traits <sup>1</sup> |             |              |              |              |              |              |              |             |       |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|-------|
|                                | len                            | dia         | aml          | samer        | OR           | NoFun        | dev          | TT           | COL         |       |
| Production Traits <sup>1</sup> |                                |             |              |              |              |              |              |              |             |       |
| ADG                            |                                | -0.23       | <b>-0.24</b> | <b>-0.13</b> | <b>-0.23</b> | <b>-0.13</b> | <b>-0.08</b> | -0.03        | 0.02        | -0.03 |
| BFAT                           |                                | <b>0.08</b> | -0.02        | -0.03        | 0.00         | <b>0.09</b>  | -0.16        | <b>-0.09</b> | <b>0.10</b> | 0.07  |

## DISCUSSIONE

Questo è il primo studio sulla stima dell'ereditabilità dei tratti morfologici della mammella della scrofa, la qualità del colostro e la loro correlazione con importanti caratteristiche riproduttive e produttive. In questo studio sono state adottate due metodologie recentemente sviluppate per la valutazione su larga scala della mammella della scrofa [11, 12] e la qualità

del colostro [13]. Metodi simili sono stati utilizzati per valutare le mammelle in pecore [14-18], vacche [19, 20] e capre [21, 22]. Le stime di ereditabilità dei tratti morfologici della mammella trovati in questo studio sulle scrofe sono state da medie ad elevate (da 0,1 a 0,53).

L'ereditabilità del numero totale di suinetti nati e il numero a dieci giorni (anche se quest'ultima variabile è stato fortemente influenzata dal cross-fostering) trovato in questo studio che ha coinvolto la razza Meidam, era simile ai valori per Landrace (rispettivamente: 0.10 e 0.09) e Yorkshire (rispettivamente 0,12 e 0,10) stimati nello studio di Nielsen, Su [23], ma leggermente inferiori rispetto ai valori trovati da Canario, Pere [24] nella stima dei parametri genetici per numero di suinetti nati vivi, il numero totale di suinetti nati e nati morti. In questo studio i risultati mostrano correlazioni sia genotipiche che fenotipiche positive e negative tra caratteristiche qualitative della mammella e caratteri produttivi e riproduttivi.

La lunghezza del capezzolo e il diametro sono stati trovati altamente ereditabili. Risultati simili, per quanto riguarda l'ereditabilità di dimensioni del capezzolo (lunghezza e diametro considerati come due tratti distinti), sono stati segnalati da Mavrogenis, Papachristoforou [25] per Chios pecore e Seykora and McDaniel [26] per le vacche Holstein. Le stime di Gootwine, Alef [27] per le pecore Assaf, e Horak and Gerza [22] per Cigaja e Valaska pecore erano molto più bassi (0,04-,21), ma in base ai punteggi piuttosto che riguardanti misurazioni lineari. Queste due dimensioni del capezzolo sono stati correlati geneticamente e fenotipicamente tra loro. Allo stesso modo, la lunghezza del capezzolo aveva una correlazione genetica positiva con la forma del capezzolo, l'orientamento e la posizione anche in bovini ( $r_g = 0.54$  al  $0,82$ ; [28]) dove questi tratti sono spesso valutati insieme come dimensioni dei capezzoli, definito come combinazione di lunghezza del capezzolo e la circonferenza [29-32].

E' stata trovata un'alta correlazione genetica positiva tra la lunghezza del capezzolo e la capacità della scrofa di allattare, espressa come il peso della nidiata a dieci giorni, anche se la robustezza di questa variabile è discutibile considerato l'alto numero di cross-fostering. Tuttavia tutti gli altri tratti sono stati negativamente geneticamente correlati con la capacità dall'allattamento della scrofa, a parte il numero totale dei capezzoli. Una correlazione genetica positiva tra la lunghezza del capezzolo e l'accrescimento ponderale giornaliero suggerisce che la lunghezza del capezzolo potrebbe essere selezionato in concomitanza con questo tratto di produzione senza alterare i processi di selezione. Una correlazione genetica e fenotipica negativa è stato registrato tra il diametro del capezzolo e il numero e il peso dei suinetti vivi a dieci giorni di età. Grandi capezzoli possono essere più difficili da succhiare e mettere in pericolo l'assunzione rapida di colostro. Complessivamente, questi risultati sono d'accordo con il precedente risultato ottenuto sulle dimensioni legate sull'associazione tra parto e la dimensione del capezzolo [12] e confermano l'ipotesi di Vasdal and Andersen [4] che le scrofe più anziane con più grande dimensione della mammella alterano l'accesso al capezzolo, che influenza negativamente la sopravvivenza dei suinetti.

Le stime della correlazione genetica tra la distanza del capezzolo alla linea mediana addominale e la distanza tra i capezzoli nella stessa fila, e con la percentuale di capezzoli non funzionali, erano alte. Questo risultato potrebbe suggerire che questi tratti sono tutti associati con le grandi dimensioni della mammella. Come previsto, la distanza tra i capezzoli nella stessa linea è stata negativamente geneticamente correlata con il numero totale di capezzoli. C'è stata una correlazione genetica positiva tra la distanza tra i capezzoli nella stessa linea e i tratti riproduttivi (totale dei suinetti nati e nati vivi) e una correlazione genetica negativa tra quei tratti e il numero totale dei capezzoli. La distanza tra i capezzoli all'interno della stessa linea è stata anche positivamente geneticamente correlata con le dimensioni della nidiata a dieci giorni e negativamente correlata con il numero di suinetti nati morti. L'ereditabilità del numero totale di capezzoli era simile ai valori medi riportati in letteratura, che vanno da 0,10 a 0,42 [6, 8, 33]. Le correlazioni genetiche tra il numero dei capezzoli e i tratti riproduttivi sono conformi con i dati

ottenuti da Pumfrey, Johnson [33] ma vi è incoerenza nella letteratura. In contrasto con i nostri risultati Allen, Tribble [34] hanno trovato che il numero totale dei capezzoli era positivamente correlato con la dimensione della nidiata alla nascita, mentre ci sono state segnalazioni di entrambe le correlazioni genetiche positive [35] e negative [33] tra la dimensione del capezzolo e il numero della nidiata allo svezzamento. Una scoperta interessante in questo studio è che il numero di suinetti nati morti negativamente correlato con il tratto distanza tra i capezzoli all'interno della stessa linea e altamente correlata positivamente con il numero totale dei capezzoli. Canario, Pere [24] ha dichiarato che il numero di suinetti nati morti è positivamente correlato con il numero di suinetti nati totali (0,58). Si può quindi suggerire che la selezione per un incremento della distanza tra i capezzoli all'interno della stessa linea, potrebbe facilitare la suzione precoce dei suinetti appena nati [36] aumentando le dimensioni della nidiata, riducendo il numero di nati morti, ma avrebbe anche un effetto negativo sul numero totale dei capezzoli. Un altro risultato interessante è la correlazione genetica tra la distanza tra i capezzoli all'interno della stessa linea e la stima della qualità del colostro. Questo risultato, accompagnato dalla correlazione genetica tra la distanza tra i capezzoli all'interno della stessa linea e le dimensioni della nidiata, suggerisce che le immunoglobuline nel colostro potrebbero essere correlate ad un aumento della dimensione della nidiata stessa. La concentrazione di immunoglobuline nel colostro è stata fortemente geneticamente e fenotipicamente correlata con il numero e il peso dei suinetti nati vivi, in contrasto con lo studio di Quesnel [37] che non ha trovato prove di una relazione tra dimensioni della nidiata e qualità del colostro. Considerando la relazione tra la distanza dei capezzoli, il loro numero e le complesse relazioni genetiche tra questi due tratti e la mortalità e l'incidenza di nati morti, decisioni attente devono essere prese al fine di selezionare per numero di capezzoli funzionali per ridurre la mortalità dei suinetti.

La stima dell'ereditabilità per la proporzione di capezzoli non funzionali corrisponde a quella osservato in studi precedenti (0,32, [38]; 0,29, [8]). La correlazione positiva tra il numero di capezzoli e capezzoli non funzionali suggerisce che la selezione di una singola caratteristica di aumento del numero dei capezzoli potrebbe aumentare il numero di capezzoli non funzionali, in linea con i risultati di Long [38] e Chalkias [8]. La percentuale di capezzoli non funzionali era alta, ma negativamente geneticamente correlata con il peso della nidiata a dieci giorni. Ciò potrebbe suggerire che le scrofe che hanno un'alta percentuale di capezzoli non funzionali non possono fornire abbastanza mammelle di buona qualità per consentire la prole di prosperare fino a dieci giorni di età. Come suggerito da Long [38], Chalkias [8] e i risultati di questo studio, è possibile affermare che l'aggiunta al sistema di selezione genetica di un coefficiente negativo sul numero di capezzoli non funzionali riduce la mortalità dei suinetti.

## **CONCLUSIONE**

Questi risultati, sono il primo del loro tipo, si faranno senza dubbio molti altri approfondimenti, ma ci sono alcune conclusioni affidabili per l'ereditabilità dei tratti della morfologia della mammella e la loro importanza per la sopravvivenza dei suinetti e le prestazioni. Tutti i tratti della mammella misurati in questo studio sono stati da moderata a elevata ereditabilità e con alcune importanti correlazioni con caratteristiche riproduttive e produttive. Queste caratteristiche dovrebbero essere incluse tra i caratteri di selezione dei suini e pesate opportunamente con gli altri tratti importanti per migliorare il progresso genetico.

## **BIBLIOGRAFIA**

- [1] BPEX. Pig Yearbook 2009. British Pork Executive (BPEX). 2009;Milton Keynes.
- [2] Baxter EM, Jarvis S, Sherwood L, Robson SK, Ormandy E, Farish M, et al. Indicators of piglet survival in an outdoor farrowing system. *Livestock Science*. 2009;124:266-76.

- [3] Bland IM, Rooke JA, Bland VC, Sinclair AG, Edwards SA. Appearance of immunoglobulin G in the plasma of piglets following intake of colostrum, with or without a delay in sucking. *Animal Science*. 2003;77:277-86.
- [4] Vasdal G, Andersen IL. A note on teat accessibility and sow parity — consequences for newborn piglets. *Livestock Science*. 2012;146:91-4.
- [5] English PR, Hammond D, Davidson FM, Smith WJ, Silver CL, Dias MFM, et al. Evaluation of a system of piglet rearing management incorporating synchronization of farrowing by use of a prostaglandin analog (ici 80996). *Animal Production*. 1977;24:139-40.
- [6] Rydhmer L. Genetics of sow reproduction, including puberty, oestrus, pregnancy, farrowing and lactation. *Livest Prod Sci*. 2000;66:1-12.
- [7] Hickman CG. Teat Shape and Size in Relation to Production Characteristics and Mastitis in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 1964;47:777-82.
- [8] Chalkias H, Rydhmer L, Lundeheim N. Genetic analysis of functional and non-functional teats in a population of Yorkshire pigs. *Livestock Science*. 2013;152:127-34.
- [9] Ding N, Guo Y, Knorr C, Ma J, Mao H, Lan L, et al. Genome-wide QTL mapping for three traits related to teat number in a White Duroc x Erhualian pig resource population. *Bmc Genetics*. 2009;10:6.
- [10] Hirooka H, de Koning DJ, Harlizius B, van Arendonk JAM, Rattink AP, Groenen MAM, et al. A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in pigs. *J Anim Sci*. 2001;79:2320-6.
- [11] Balzani A, Cordell HJ, Edwards SA. Development of a methodology to describe udder conformation in sows. *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2015;5:1-8.
- [12] Balzani A, Cordell HJ, Sutcliffe E, Edwards SA. Sources of variation in udder morphology of sows. *J Anim Sci*. 2016;94 394-400.
- [13] Balzani A, Cordell HJ, Edwards SA. Evaluation of an on-farm method to assess colostrum IgG content *Animal : an international journal of animal bioscience*. 2015;11:1-6.
- [14] Casu S, Pernazza I, Carta A. Feasibility of a Linear Scoring Method of Udder Morphology for the Selection Scheme of Sardinian Sheep. *Journal of Dairy Science*. 2006;89:2200-9.
- [15] delaFuente LF, Fernandez G, SanPrimitivo F. A linear evaluation system for udder traits of dairy ewes. *Livest Prod Sci*. 1996;45:171-8.
- [16] Fernandez G, Alvarez P, San Primitivo F, de la Fuente LF. Factors Affecting Variation of Udder Traits of Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science*. 1995;78:842-9.
- [17] Huntley SJ, Cooper S, Bradley AJ, Green LE. A cohort study of the associations between udder conformation, milk somatic cell count, and lamb weight in suckler ewes. *Journal of Dairy Science*. 2012;95:5001-10.
- [18] Labussiere J, Dotchewski D, Combaud JF. Morphological-characteristics of the udder of lacaune ewes and relationships with milkability - methodology used for collection of data. *Annales De Zootechnie*. 1981;30:115-36.
- [19] Kuczaj M. Changes in the genetic pool and milk performance of the primiparous cow population in Poland. *Medycyna Weterynaryjna*. 2003;59:826-8.
- [20] Seykora AJ, McDaniel BT. Udder and Teat Morphology Related to Mastitis Resistance: A Review. *Journal of Dairy Science*. 1985;68:2087-93.

- [21] HABT EHHAHG. Production and composition of sow's milk. *J Nutr.* 1935:11.
- [22] Horak F, Gerza J. A morphological study of the goat's udder. *Acta Universitatis Agriculturae Brno.* 1969;17:189-99.
- [23] Nielsen B, Su G, Lund MS, Madsen P. Selection for increased number of piglets at d 5 after farrowing has increased litter size and reduced piglet mortality. *J Anim Sci.* 2013;91:2575-82.
- [24] Canario L, Pere MC, Tribout T, Thomas F, David C, Gogue J, et al. Estimation of genetic trends from 1977 to 1998 of body composition and physiological state of Large White pigs at birth. *Animal : an international journal of animal bioscience.* 2007;1:1409-13.
- [25] Mavrogenis AP, Papachristoforou C, Lysandrides P, Roushias A. Environmental and genetic factors affecting udder characters and milk production in Chios sheep. *Genetics Selection Evolution.* 1988;20:477-88.
- [26] Seykora AJ, McDaniel BT. Genetic and environmental variation in udder heights, cleft and teat measures. *Journal of Dairy Science.* 1981;64:84.
- [27] Gootwine E, Alef B, Gadeesh S. Udder conformation and its heritability in the assaf(awassi x east-friesian) cross of dairy sheep in israel. *Annales De Genetique Et De Selection Animale.* 1980;12:9-13.
- [28] Vukasinovic N, Moll J, Künzi N. Analysis of productive life in Swiss Brown cattle. *Journal of dairy science.* 1997;80:2572-9.
- [29] Bradford HL, Moser DW, Minick Bormann J, Weaver RL. Estimation of genetic parameters for udder traits in Hereford cattle. *J Anim Sci.* 2015;93:2663-8.
- [30] Bunter KL, Johnston DJ. Genetic parameters for calf mortality and correlated cow and calf traits in tropically adapted beef breeds managed in extensive Australian production systems. *Animal production science.* 2014;54:50-9.
- [31] Kirschten DP. Genetic parameters of linear type traits for beef cattle and their correlation with production of Simmental cows: Montana State University, Bozeman; 2001.
- [32] Sapp RL, Rekaya R, Bertrand JK. Teat scores in first-parity Gelbvieh cows: Relationship with suspensory score and calf growth traits. *J Anim Sci.* 2004;82:2277-84.
- [33] Pumfrey RA, Johnson RK, Cunningham PJ, Zimmerman DR. Inheritance of teat number and its relationship to maternal traits in swine. *J Anim Sci.* 1980;50:1057-60.
- [34] Allen AD, Tribble LF, Lasley JF. Inheritance of nipple numbers in swine and the relationship to performance. *Missouri agricultural experiment station research bulletin.* 1959:694.
- [35] Korkman N. Causes of variation in the size and weight of litters from sows. *Acta Agriculturae Suecana.* 1947;2:253-310.
- [36] Balzani A, Cordell HJ, Edwards SA. Does sow udder conformation influence teat access by newborn piglets? . *Theriogenology.* Submitted 2015.
- [37] Quesnel H. Colostrum production by sows: variability of colostrum yield and immunoglobulin G concentrations. *Animal : an international journal of animal bioscience.* 2011;5:1546-53.
- [38] Long T, Aasmundstad T, Holm B. Genetics of teat quantity and quality in Norwegian Landrace. *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 1st–6th of August, Leipzig, Germany, ID8672010.*



**PREMIO GIOVANE LAUREATO 2016**



# DENSITÀ DI PLASMACELLE NELLE VIE GENITALI DI SCROFETTE

DE LUCIA A., BIANCO C., OSTANELLO F., AVALLONE G., NANNONI E., SARLI G.

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*

**Parole chiave:** immunità mucosale, plasmacellule, apparato genitale, scrofetta

*Key words:* mucosal immune system, plasma cells, genital tract, gilt

## **Riassunto**

L'immunità mucosale svolge un ruolo importante come prima linea di difesa contro molti patogeni. E' quindi importante definire, nei diversi tratti dell'apparato genitale femminile, quale sia la risposta mucosale e quanto essa sia influenzata dallo stato gravidico. Campioni prelevati da 3 segmenti dell'apparato genitale (vagina, cervice e utero) di 24 scrofette di 6 mesi di età sono stati esaminati utilizzando una metodica immunocitochimica per l'identificazione delle plasmacellule (PC) producenti le immunoglobuline di isotipo A, G ed M. Mediante analisi di immagine è stata eseguita anche la valutazione della densità delle PC. L'endometrio è risultato essere il segmento in cui la densità di PC è maggiormente influenzata dalle variazioni ormonali dovute alla gravidanza. In soggetti non gravidi si è registrato un gradiente di concentrazione decrescente di PC totali (producenti IgA+IgM+IgG) procedendo dalla zona sub-epiteliale a quella ghiandolare superficiale ed infine alla ghiandolare profonda. Nei soggetti gravidi tale gradiente non si osserva in conseguenza della progressiva diminuzione, soprattutto di PC producenti IgA nello strato sub-epiteliale e di PC IgA+ e IgG+ nello strato ghiandolare superficiale. Indipendentemente dallo stato di gravidanza, nell'utero la densità maggiore si registra per PC contenenti l'isotipo anticorpale IgA. In cervice e vagina non si registrano variazioni significative nel confronto fra soggetti gravidi e non gravidi nel numero di PC totali. Inoltre la cervice si è rivelata, nei soggetti non gravidi, il distretto delle vie genitali con più alta densità di PC totali, con uno cambiamento di isotipo anticorpale prevalente rappresentato dalle IgG.

## **Abstract**

The mucosal immunity plays an important role as a first line of defense against pathogens, it is therefore interesting to investigate its role in the sow genital tract and if it is influenced by pregnancy. Three sites of genital tract (vagina, cervix, uterus) of 24 gilts, 6 months old, 12 pregnant and 12 non-pregnant have been sampled. In order to detect IgA, IgG and IgM producing plasma cells (PCs) an immunohistochemical assay was performed and an image analysis has been used to assess plasma cells density. The endometrium revealed to be the only segment where the PC density is affected by hormonal changes during pregnancy. In non-pregnant gilts, there was a decreasing gradient of total PC density (i.e. the sum of those producing IgA, IgM, IgG) from sub-epithelial area to the glandular superficial and finally to the deep glandular. In pregnant subjects this gradient is not observed as a result of the progressive decrease, especially of IgA-producing PCs in the sub-epithelial layer and of IgA and IgG + PCs in the superficial glandular layer. Regardless of the state of pregnancy, the uterus has the highest density of PC containing IgA isotype. In the cervix and vagina, there were no significant changes comparing pregnant and nonpregnant subjects in the total number of PCs. Furthermore the cervix revealed, in non-pregnant, the district of genital tract with the highest density of total PC, with a predominant antibody isotype change represented by IgG.

## **INTRODUZIONE**

L'immunità c.d. mucosale, cioè la risposta immunitaria specifica in essere sulle superfici mucose, è costituita sia da una stimolazione locale sia da una colonizzazione periferica di cellule immunocompetenti che si sono sensibilizzate altrove. In quest'ultimo caso, le cellule immunocompetenti vengono generate in seguito ad una risposta sistemica verso uno o più antigeni; tali cellule, integrando la popolazione immunocompetente locale delle superfici mucose, garantiscono un potenziamento della risposta specifica mucosale (7). Diverse indagini sperimentali hanno dimostrato come la somministrazione parenterale di un antigene possa stimolare anche la risposta locale mucosale e, per quanto riguarda le mucose dell'apparato digerente, in particolare quelle del piccolo intestino, le evidenze sperimentali a conferma di ciò sono molteplici (1, 3). E' comunque noto che non tutte le superfici mucose giovano con la stessa intensità dell'effetto sopra descritto in seguito a stimolazione sistemica ed inoltre molto scarse sono le informazioni in merito alle mucose delle vie genitali (10). Agenti patogeni, dannosi per l'integrità morfo-funzionale dell'utero o per i prodotti del concepimento, possono raggiungere le vie genitali per via ematica (via discendente) o risalendo le vie stesse dall'esterno (via ascendente). E' pertanto importante definire, nei diversi tratti dell'apparato genitale femminile (vagina, cervice, utero), se la risposta mucosale sia simile e quanto essa sia influenzata dallo stato gravidico che, come è noto, si caratterizza per l'induzione di una ipo-reattività immunologica locale con la finalità di evitare il "rigetto" del feto in risposta ad antigeni placentari di origine paterna, non tollerati dal sistema immunitario della madre (5,9).

Scopo di questo lavoro è stato quello di quantificare le plasmacellule (PC) produttrici dei 3 principali isotipi anticorpali potenzialmente presenti sulle superfici mucose (IgG, IgM, IgA) riscontrate in 3 tratti (vagina, cervice, utero) di scrofette gravide e non gravide, con la finalità di valutare eventuali differenze nei tratti a confronto e stimare l'influenza dello stato gravidico sul contenuto di PC immunoglobulino secernenti nelle vie genitali.

## **MATERIALI E METODI**

### **Animali**

Nello studio sono incluse scrofette di razza Large White di circa 6 mesi di età, provenienti da un allevamento convenzionale, e stabulate nei locali del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna.

I soggetti facevano parte di piani sperimentali che prevedevano un protocollo di superovulazione (i.m 1500 UI di eCG - equine chorionic gonadotropin) e 750 UI di hCG (human chorionic gonadotropin)) seguito da una inseminazione con 1 o 2 dosi di seme (2, 8). I campioni oggetto di questa indagine sono stati prelevati da 12 scrofette scelte a caso tra quelle gravide e da 12 tra quelle non gravide, per un totale di 24 soggetti.

I protocolli di sperimentazione sono stati approvati dal Comitato Etico per la Sperimentazione Animale dell'Università di Bologna e dal Ministero della Salute. Gli studi sono stati condotti in accordo con quanto previsto dalla normativa europea relativamente alla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali (Direttiva del Consiglio europeo, 86/609/EEC).

### **Indagini sierologiche**

La determinazione dei titoli anticorpali nei confronti di Porcine Circovirus type 2 (PCV2), Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (PRRSV), Aujeszky's Disease virus (ADV) e Porcine Parvovirus (PPV) è stata condotta su campioni di siero prelevati 2 giorni prima dell'inseminazione (giorno -2) e al momento della soppressione.

## **Prelievo dei campioni**

I soggetti gravidi sono stati soppressi a 50 giorni di gravidanza con un protocollo farmacologico autorizzato dal Comitato Etico ed applicato anche ai soggetti non gravidi. Tutti i 24 soggetti sono stati sottoposti a necropsopia. Da ciascun soggetto sono state prelevate una porzione di vagina (V), cervice (C) e 3 segmenti di utero equidistanti a livello di corna ed alla base delle corna (UT1; UT2; UT3). Successivamente, i tessuti sono stati fissati in formalina al 10% e quindi inclusi in paraffina. Da ogni blocchetto di paraffina si sono ottenute 4 sezioni di 4  $\mu\text{m}$  di spessore. Di queste 4 sezioni, una è stata colorata con ematossilina-eosina (E-E) e 3 con colorazioni immunostochimiche che utilizzano anticorpi specifici per le immunoglobuline IgG, IgA e IgM di suino secondo protocolli già pubblicati (1).

I campioni di tessuto sono stati osservati con microscopio ottico Leica DMLB su cui era montata una fotocamera digitale Leica, per permettere di acquisire le immagini dei campi di osservazione. Le immagini acquisite sono state quindi trasferite su computer mediante un software di acquisizione compatibile InfanView, al fine di effettuare la conta cellulare utilizzando come software di analisi d'immagine ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

L'analisi qualitativa e quantitativa della PC è stata condotta sui 4 segmenti del tratto genitale: cervice, vagina, corpo uterino, corna uterine. Per la cervice e la vagina i conteggi sono stati eseguiti su 5 campi acquisiti a livello della zona sub-epiteliale (figura 1); per l'utero, la sottomucosa è stata suddivisa in tre zone: sub-epiteliale (a1), ghiandolare superficiale (a2) e ghiandolare profonda (a3) (figura 2) ed in ogni area sono state acquisite immagini relative a 5 campi. Tutte le immagini sono state acquisite a 40x.

Per ogni zona è stata selezionata manualmente la lamina propria escludendo la componente ghiandolare, vascolare ed epiteliale ed eventuali aree di artefatti dovuti alla processazione del campione con l'obiettivo di ottenere un'area di stima minima di 4000  $\mu^2$  all'interno della quale sono state contate le PC. In seguito si è proceduto alla conta manuale delle PC presenti all'interno dell'area identificata e di quelle intersecanti la linea di delimitazione dell'area. La densità delle PC è stata poi normalizzata come numero di plasmacellule/10000  $\mu^2$ . In totale sono state effettuate 2400 misurazioni, 100 per ciascun soggetto.

## **Analisi statistica**

Preliminarmente, la normalità della distribuzione campionaria è stata valutata utilizzando il test di Shapiro-Wilk. Sulla base dei risultati ottenuti, per i successivi confronti sono stati utilizzati il test di Kruskal-Wallis, il test di Mann-Whitney e il test di Friedman ANOVA. La significatività statistica è stata posta per  $p=0,05$ . L'analisi statistica è stata eseguita con il software Statistica 8 (Statsoft Inc, Dell Texas, US).

## **RISULTATI**

Non sono stati messi in evidenza incrementi dei titoli anticorpali anti PCV2, PRRSV, PPV e ADV tra il giorno -2 e il giorno dell'eutanasia; tutti i soggetti sono risultati costantemente negativi alla ricerca di anticorpi anti gE di ADV.

In tabella 1 sono riportati i risultati relativi alla densità di PC nei diversi tratti dell'apparato genitale ed in figura 3 esempi delle reazioni immunostochimiche.

Nella vagina non è stata messa in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa nella densità totale di PC (calcolata come somma di PC secernenti IgG, IgM e IgA) tra i soggetti gravidi e non gravidi. Nessuna differenza statisticamente significativa è stata osservata confrontando le densità di PC producenti i singoli isotipi tra soggetti gravidi e non gravidi.

Per quanto riguarda la cervice, la gravidanza non influenza la densità totale di PC, ma si osserva una significativa maggiore densità di PC contenenti IgG nei soggetti non gravidi confrontati con quelli gravidi ( $p < 0,01$ ).

Confrontando, tra animali gravidi e non, i risultati ottenuti nei segmenti uterini, sono stati evidenziati due pattern distinti. Complessivamente nell'utero di soggetti gravidi si sono registrate densità di PC totali significativamente più basse ( $P < 0,001$ ) di quelle di soggetti non gravidi. Tale differenza è stata osservata anche prendendo in considerazione la densità delle sole PC secernenti IgG ( $P < 0,05$ ) o IgA ( $P < 0,001$ ). Nei soggetti non gravidi è presente un gradiente decrescente di PC, la cui densità diminuisce spostandosi dalla zona sub-epiteliale alla zona ghiandolare profonda; in questi animali è stata evidenziata una densità significativamente maggiore di PC secernenti IgA ( $p < 0,001$ ) rispetto a quelle secernenti gli altri due isotipi. In particolare, le PC secernenti IgA presentano una densità significativamente maggiore nell'area sub-epiteliale e ghiandolare superficiale rispetto all'area ghiandolare profonda (rispettivamente:  $p < 0,001$  e  $p < 0,05$ ). Nei soggetti gravidi, invece, la densità di PC nell'utero si riduce significativamente poiché non si registra più il gradiente decrescente e la variazione è sostenuta da riduzione della densità di PC contenenti IgA prevalentemente a livello di strato ghiandolare superficiale ( $P < 0,01$ ) e di quelle contenenti IgA ( $p < 0,01$ ) e IgG ( $p < 0,05$ ) nello strato ghiandolare superficiale e, di conseguenza, delle totali ( $p < 0,01$ ).

Le PC contenenti IgA rappresentano la quota significativamente maggiore, nel confronto con gli altri isotipi, nell'utero sia gravido ( $P < 0,001$ ) che non gravido ( $p = 0,001$ ). Le plasmacellule contenenti IgA sono maggioritarie anche in vagina, mentre nella cervice prevalgono quelle contenenti IgG, in soggetti non gravidi. Nel confronto tra i 3 tratti (vagina, cervice, utero), sia nei soggetti gravidi che in quelli non gravidi il distretto che presenta una densità di PC totali significativamente maggiore è la cervice ( $P < 0,05$ ).

## DISCUSSIONE

Nelle diverse zone dell'apparato riproduttore della scrofa, la densità di plasmacellule secernenti immunoglobuline non è costante ed è influenzata, in maniera diversa, dallo stato ormonale conseguente alla gravidanza. Nella vagina, spesso indicata come organo con caratteristiche intermedie tra il tessuto linfoide associato alla pelle (SALT) e il tessuto linfoide associato alle mucose (MALT), e nella cervice, la densità totale delle PC non varia in maniera significativa con lo stato gravidico. La cervice è il tratto di apparato genitale con la maggiore densità di PC, con una predominanza di quelle secernenti IgG, nei soggetti non gravidi. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da Wu et al., (2000), i quali definiscono la cervice il sito immunologicamente più attivo dell'apparato genitale, in quanto "di guardia" fra il tratto genitale inferiore che comprende la vagina, e il tratto genitale superiore composto da utero e tube di Falloppio. In merito all'isotipo predominante in cervice, Hussen et al., (1983), esaminando scrofe di 2 anni di età, enfatizzano un maggior contenuto di PC producenti IgA, basandosi tuttavia esclusivamente sul confronto dei risultati grezzi, senza il supporto dell'analisi statistica. Per giustificare la divergenza fra i risultati del presente lavoro (predominanza delle IgG in cervice) e quelli ottenuti da Hussen et al., (1983) (nessuna differenza tra le diverse localizzazioni) si può ipotizzare l'azione di un fattore legato alla diversa età degli animali utilizzati nei 2 studi.

Per quanto riguarda l'endometrio degli animali non gravidi, è stato osservato un gradiente decrescente di PC, la cui densità diminuisce spostandosi dalla zona sub-epiteliale alla zona ghiandolare profonda. Questa diversa densità di PC nei diversi strati della parete uterina ha un andamento inverso rispetto a quello riscontrato nell'intestino (1), dove è stato osservato un aumento della densità delle PC lungo l'asse villo-crypta. La spiegazione di questa differenza risiede probabilmente in una diversa funzione delle ghiandole di questi due apparati: nell'intestino le ghiandole sono principalmente deputate alla secrezione di muco che deve contenere immunoglobuline, mentre nello stroma endometriale la componente ghiandolare non deve secernere muco contenente immunoglobuline, ma prioritariamente secreto utile nelle prime fasi della gravidanza.

Inoltre, secondo i risultati del presente lavoro, l'assetto ormonale legato alla gravidanza annulla il gradiente decrescente di PC riscontrato negli animali non gravidi, inducendo una riduzione delle PC secernenti IgA prevalentemente a livello di strato sub-epiteliale e di PC secernenti IgA e IgG nello strato ghiandolare superficiale dell'utero. Queste osservazioni sono solo parzialmente confrontabili con quelle presenti in letteratura, in quanto Hussen et al., (1983) hanno preso in considerazione solo animali non gravidi mentre Kaeoket et al., (2003) riportano solo la densità totale di PC senza discriminare la produzione dei diversi isotipi. Kaeoket et al., (2003) riferiscono invece di un pattern di distribuzione inverso, crescente dall'alto verso il basso, senza tuttavia fornire una validazione statistica.

In merito alla predominanza di PC secernenti IgA rispetto alla densità di PC secernenti altri isotipi, riscontrata sia nei soggetti gravidi sia in quelli non gravidi, le osservazioni condotte nel presente lavoro risultano essere solo parzialmente confrontabili con altri risultati presenti in letteratura, poiché non sono disponibili, a nostra conoscenza, studi condotti su animali gravidi. I risultati ottenuti sono però in contrasto con quanto riportato da Hussen et al., (1983) che asseriscono essere le IgG le PC più numerose nell'utero delle scrofe non gravide. Tuttavia, anche questa affermazione, deriva dalla valutazione dei dati grezzi, senza nessuna validazione statistica.

I risultati della presente indagine individuano quindi nell'utero il distretto mucosale delle vie genitali più influenzato dalla gravidanza con l'induzione di una forte riduzione di PC contenenti IgA, che comunque resta l'isotipo più frequente indipendentemente dalla gravidanza. La cervice invece è il tratto più ricco di PC in assoluto con prevalenza di IgG nei soggetti non gravidi. Sono comunque necessari ulteriori studio per stimare variazioni legate all'età e come la risposta mucosale locale possa variare con l'esposizione ad agenti eziologici potenzialmente in grado di causare turbe riproduttive nella scrofa.

## **RINGRAZIAMENTI.**

Si ringraziano Merial S.A.S. (Lione-Francia) per avere supportato lo studio, i gruppi di ricerca della Prof.ssa Maria Laura Bacci e del Prof. Luca Sardi del DIMEVET (Bologna) per la gestione della parte in vivo dell'esperimento e la Dott.ssa V. Felice per il sostegno datomi durante la stesura della tesi da cui questo lavoro è tratto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bianco, C., Felice, V., Panarese, S., Marrocco, R., Ostanello, F., Brunetti, B., Muscatello, L.V., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Sarli, G., 2014. Quantitative immunohistochemical assessment of IgA, IgM, IgG and antigen-specific immunoglobulin secreting plasma cells in pig small intestinal lamina propria. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 160, 281–287.
2. Bianco, C., Sarli, G., Panarese, S., Bacci, M.L., Galeati, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Lelli, D., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Ostanello, F., 2015. PCV2 Infection in Vaccinated Conventional Gilts Inseminated with PCV2b-Spiked Semen. *Pak. Vet. J.* 35, 293-298.
3. Bourges, D., Chevalyere, C., Wang, C., Berri, M., Zhang, X., Nicaise, L., Meurens, F., Salmon, H., 2007. Differential expression of adhesion molecules and chemokines between nasal and small intestinal mucosae: implications for T- and sIgA + B-lymphocyte recruitment. *Immunology* 122, 551–561.
4. Hussein, A.M., Newby, T.J., Bourne, F.J., 1983. Immunohistochemical studies of the local immune system in the reproductive tract of the sow. *J. Reprod. Immunol.* 5, 1-15.

5. Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.M., 2001. The sow endometrium at different stages of the oestrous cycle: studies on morphological changes and infiltration by cells of the immune system. *Anim. Reprod. Sci.* 65, 95–114.
6. Kaeoket, K., Persson, E., Dalin, A.-M., 2003. Influence of pre-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. *Anim. Reprod. Sci.* 75, 55–71.
7. Lamichhane, A., Azegami, T., & Kiyono, H., 2014. The mucosal immune system for vaccine development. *Vaccine*, 32, 49, 6711-6723.
8. Sarli, G., Morandi, F., Panarese, S., Bacci, B., Ferrara, D., Bianco, C., Fusaro, L., Bacci, M.L., Galeati, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Lelli, D., Leotti, G., Vila, T., Joisel, F., Allan, G., Benazzi, C., Ostanello, F., 2012. Reproduction in porcine circovirus type 2 (PCV2) seropositive gilts inseminated with PCV2b spiked semen. *Acta Vet Scand.* 54:51.
9. Segerson, E.C., Beetham, P.K., 2000. Immunosuppressive macromolecules of endometrial and conceptus origins in livestock species. *J. Reprod. Immunol.* 48, 27–46
10. Wilson, H.L., Obradovic, M.R., 2014. Evidence for a common mucosal immune system in the pig. *Mol. Immunol.*
11. Wu, H.-Y., Abdu, S., Stinson, D., Russell, M.W., 2000. Generation of female genital tract antibody responses by local or central (common) mucosal immunization. *Infect. Immun.* 68, 5539–5545.

**Tabella 1.** Media±deviazione standard del numero di plasmacellule/10000  $\mu^2$  nei diversi tratti dell'apparato riproduttivo delle scrofette, con dati totali (ultima colonna) e separati per isotipo anticorpale. NG = non gravidi; G = gravidi.

*Table 1. Mean  $\pm$  standard deviation of the plasma cells number / 10000  $\mu^2$  in the different segments of the genital tract. Data of antibody isotype containing PC and of total PC total are shown for non-pregnant (NG) and pregnant (G) gilts.*

| Tratto genitale | zona | IgA           |               | IgG           |               | IgM           |               | PC tot        |               |
|-----------------|------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                 |      | NG            | G             | NG            | G             | NG            | G             | NG            | G             |
| Vagina          |      | 2,3 $\pm$ 1,4 | 2,1 $\pm$ 1,4 | 1,9 $\pm$ 1,4 | 2,0 $\pm$ 2,0 | 1,0 $\pm$ 0,9 | 1,7 $\pm$ 0,6 | 5,2 $\pm$ 2,1 | 3,6 $\pm$ 3,1 |
| Cervice         |      | 1,9 $\pm$ 0,7 | 2,2 $\pm$ 2,2 | 3,4 $\pm$ 3,1 | 2,2 $\pm$ 1,8 | 1,2 $\pm$ 1,2 | 1,5 $\pm$ 0,7 | 6,6 $\pm$ 3,8 | 5,0 $\pm$ 3,4 |
| Utero           | a1   | 2,0 $\pm$ 1,9 | 1,3 $\pm$ 3,3 | 1,4 $\pm$ 2,4 | 0,6 $\pm$ 2,3 | 0,6 $\pm$ 0,7 | 0,7 $\pm$ 1,1 | 3,9 $\pm$ 3,4 | 2,3 $\pm$ 4,4 |
|                 | a2   | 1,1 $\pm$ 1,1 | 0,2 $\pm$ 0,5 | 0,5 $\pm$ 0,7 | 0             | 0,4 $\pm$ 0,5 | 0,4 $\pm$ 0,7 | 2,0 $\pm$ 1,9 | 0,5 $\pm$ 0,8 |
|                 | a3   | 0,2 $\pm$ 0,4 | 0             | 0,2 $\pm$ 0,5 | 0             | 0             | 0             | 0,3 $\pm$ 0,6 | 0             |

Figura 1. Sezioni di cervice (a sinistra) e di vagina (a destra) in cui viene indicata l'area (zona sub-epiteliale) di conteggio.

Figure 1: Pictures of cervix (on the left) and of vagina (on the right) in which the zone (sub-epithelial) of cell count is indicated.

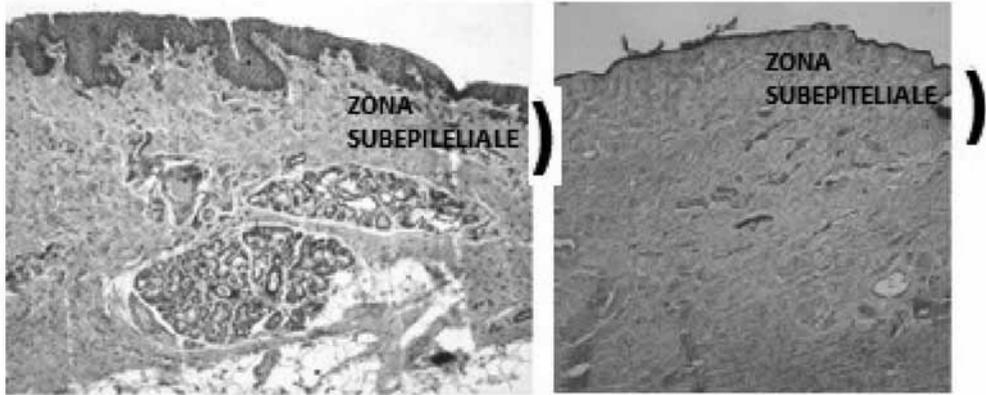


Figura 2 - A sinistra disegno raffigurante gli strati della parete uterina in cui, nell'endometrio, vengono indicati i livelli di profondità (zone) oggetto di conteggio. Sulla destra la microfotografia di una sezione di utero della casistica in esame colorata con ematosillina eosina con indicazione delle zone.

Figure 2: On the left a tracery of the uterine wall layers and the zones of the endometrium evaluated for PC density. On the right an histologic picture with the indication of the area 1 (a1), area 2 (a2) and area 3 (a3) zones.

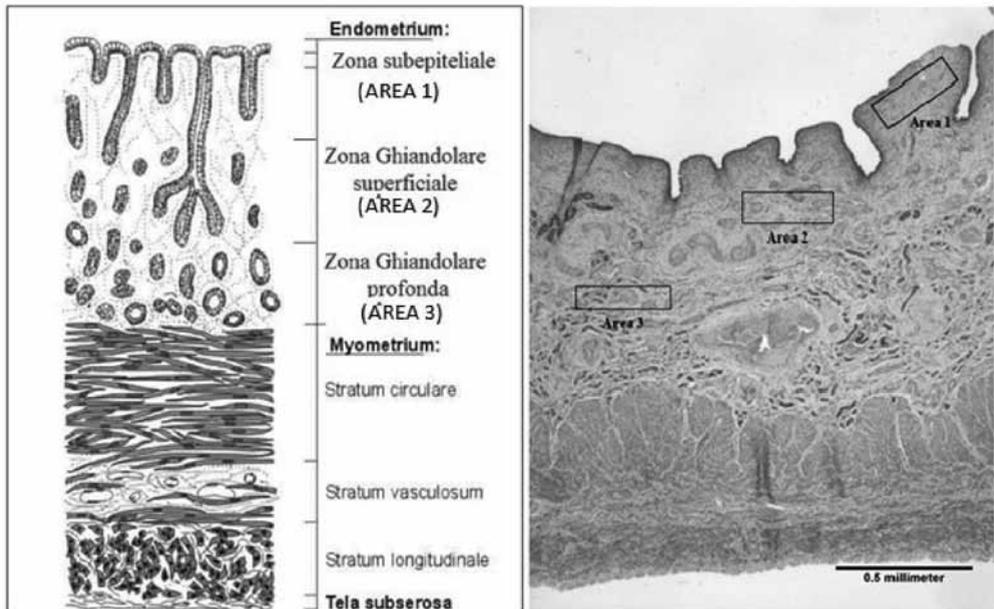
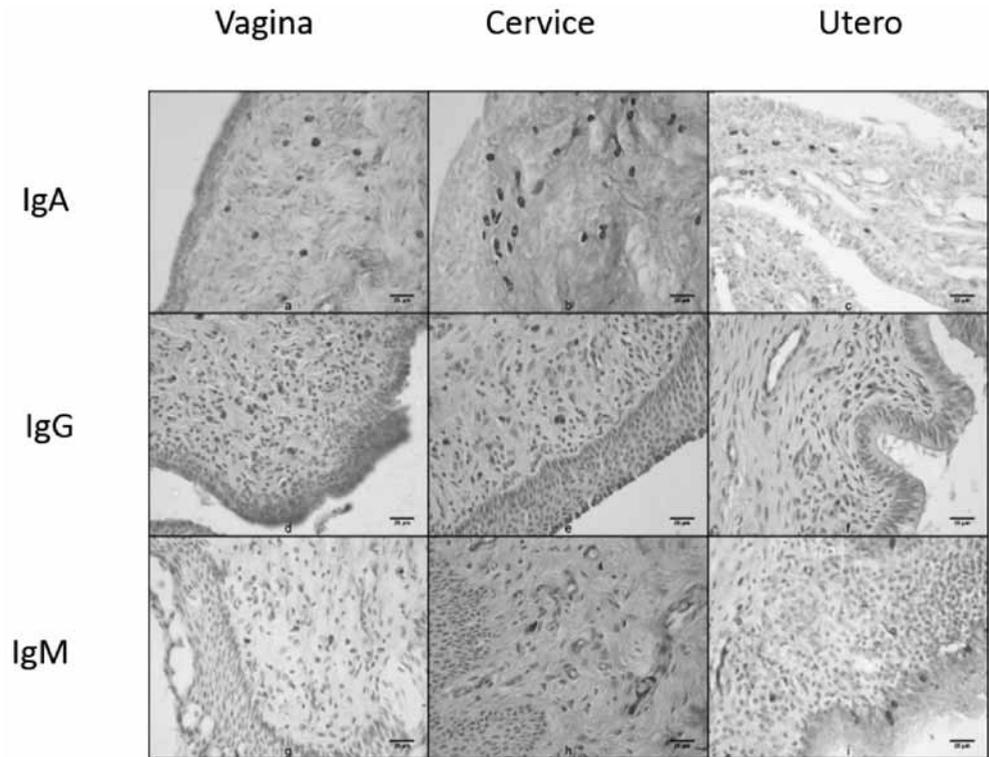


Figura 3. Quadri di reazioni immunistochemiche con anticorpi anti-IgA, -IgG e -IgM di suino in vagina, cervice ed utero di suino.

Figure 3. Pictures of immunohistochemical stain by anti-swine IgA, IgM and IgG in vagina, cervix and uterus.







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**

# 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*

# *ONESTEP FORWARD*

on **PRRS**



il Riferimento  
nella Prevenzione  
in Salute Animale

# We add performance to your business



**HUVEPHARMA®**

We add performance to your business



**Huvepharma AD**

5<sup>th</sup> Floor, 3<sup>a</sup> Nikolay Haytov Str.  
1113 Sofia, **Bulgaria**  
Tel.: +359 2 862-5331  
Fax: +359 2 862-5334  
e-mail: [sales@huvepharma.com](mailto: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](mailto:customerservice@huvepharma.com)

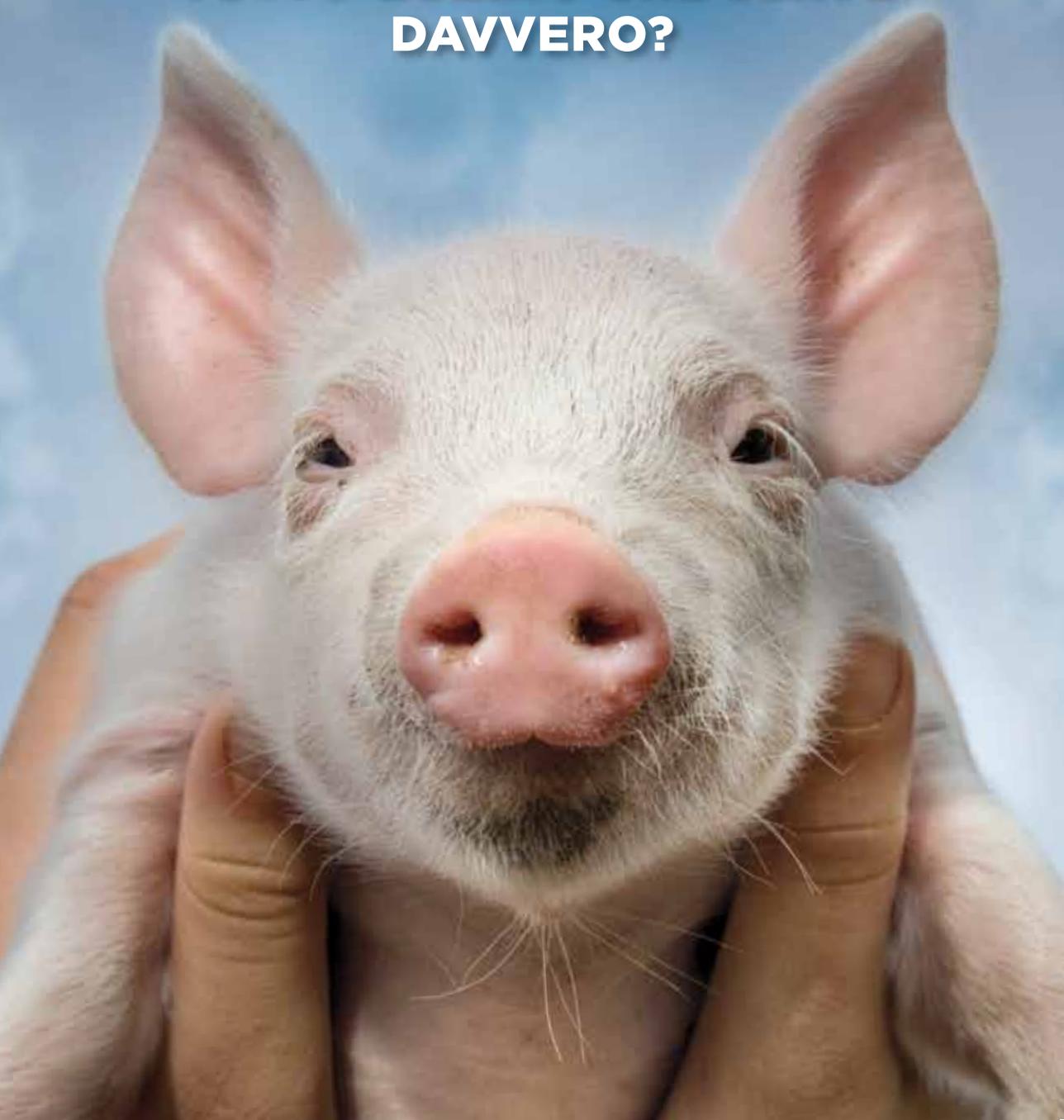
**Contatti per l'Italia:**

[gabriele.festi@huvepharma.com](mailto:gabriele.festi@huvepharma.com)  
[paolo.mondin@huvepharma.com](mailto:paolo.mondin@huvepharma.com)

# **INFLUENZA**

## **H1N1 - H1N2 - H3N2**

**SEI SICURO DI AVERE  
TUTTO QUELLO CHE SERVE  
DAVVERO?**





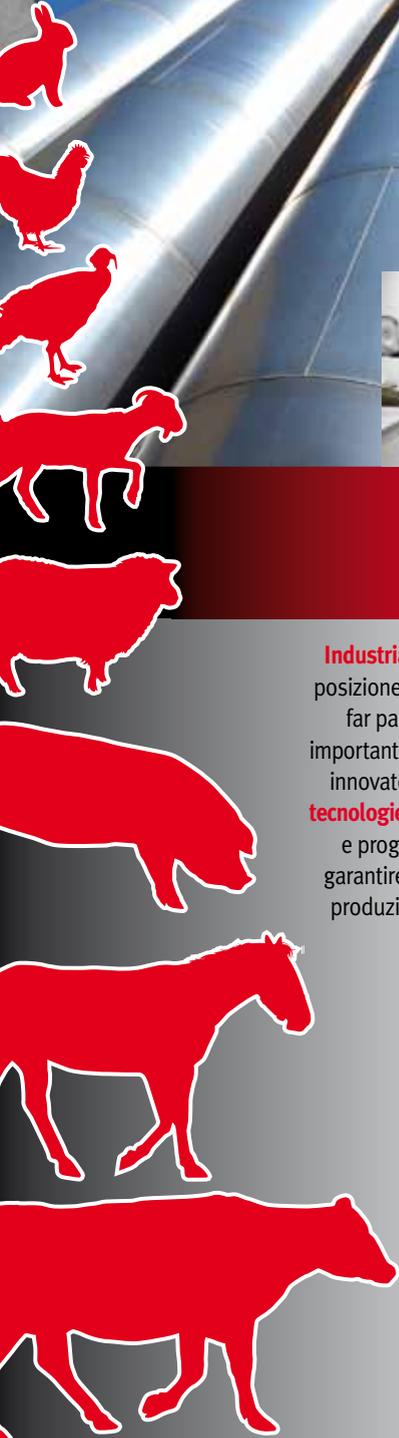
**MSD**

Animal Health



# La Scienza per animali più Sani





**Qualità & Innovazione**



## Dal 1968, farmaco e nutrizione per i vostri animali

**Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.**, fondata nel 1968, ha progressivamente conquistato una posizione di leadership nel settore della salute e dell'alimentazione animale e, dal 2014, è entrata a far parte del **gruppo aniMedica GmbH**. Il percorso che ha condotto l'azienda a rivestire un ruolo importante nel panorama veterinario - in Italia e all'estero - è stato naturalmente suggerito dai principi innovatori che hanno caratterizzato la società sin dalla sua costituzione. **TREI** ha sempre adottato **tecnologie all'avanguardia**, operando in linea con i rigidi parametri delle Buone Pratiche di Produzione e programmi di aggiornamento costante sia dei collaboratori che degli impianti con l'obiettivo di garantire **prodotti sicuri e di elevata qualità** al singolo Cliente. La sede amministrativa, l'officina di produzione e i magazzini sono situati a **Rio Saliceto**, in provincia di Reggio nell'Emilia e occupano una superficie di 16.000 metri quadrati, di cui oltre 10.000 coperti.



## IL MONDO STA CAMBIANDO IL NOSTRO IMPEGNO RESTA SALDO



Dal 1933, siamo un'azienda di proprietà familiare esclusivamente dedicata alla salute animale.

Miglioriamo costantemente la nostra offerta di prodotti e servizi innovativi in tutto il mondo, restando fedeli ai valori per i quali i nostri clienti ci scelgono da sempre:

il nostro impegno ad ascoltare, capire e rispettare le esigenze locali e globali.

Vétoquinol Italia S.r.l.  
Via Piana 265 - 47032 Bertinoro (FC) - Italy  
Tel. +39 0543 462 411 Fax +39 0543 448 644  
vetoquinol.italia@vetoquinol.com

[vetoquinol.it](http://vetoquinol.it)

223

 **vetoquinol**  
ACHIEVE MORE TOGETHER

# RISPETTIAMO LA NATURA, DI OGNI MAIALE.



**ZOETIS SI IMPEGNA AD ACCRESCERE LA SOSTENIBILITÀ**  
della produzione di carne suina, proponendo soluzioni innovative  
per una alimentazione sicura, di qualità e responsabile.

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

zoetis

Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS  
per il 2016 si svolgono con il contributo di:



**Bayer HealthCare**  
Animal Health



**Boehringer  
Ingelheim**



**chemifarma** S.p.A.  
CAPITALE SOCIALE € 40.000.000,00 - SEDE SOCIALE: VERGATO



**Dechra**  
Veterinary Products



**ecuphar**<sup>®</sup>



**HUVEPHARMA**<sup>®</sup>  
We add performance to your business!



**MERIAL**  
A SANOFI COMPANY



**MSD**  
Animal Health



**vetoquinol**  
ACHIEVE MORE TOGETHER

