

Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS
per il 2017 si svolgono con il contributo di:



ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLIII MEETING ANNUALE



Reggio Emilia

16-17 Marzo 2017

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2017

INDICE

Prefazione	17
------------------	----

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO “CASI CLINICI IN SUINICOLTURA: PRRS E NON SOLO”

Parma, 7 Ottobre 2016

UN EPISODIO PARTICOLARMENTE GRAVE DI ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV) IN SUINETTI DI SVEZZAMENTO (LO STRANO CASO DEI SUINETTI MORTI ALL'IMPROVISO IN SVEZZAMENTO)

Sandri G.P., Alborali G.L., Corradi A., Cantoni A.M., Giovanardi D......21

MAL ROSSINO IN SUINETTI SOTTOSCroFA

Pellacini M., Canelli E., Luppi A......25

SALMONELLA CHOLERAESUIS IN SUINETTI IN SVEZZAMENTO

Salvini F......31

MORTALITÀ SOTTOSCroFA

Bardini R.33

INTOSSICAZIONE DA ARSENICO IN SUINI ALL'INGRASSO

Scollo A.35

ATTI DEL XLIII MEETING ANNUALE Reggio Emilia, 16-17 Marzo 2017

PIÙ PRODUTTIVITÀ E MENO ANTIBIOTICI? YES, WE CAN! PARTE I

STRATEGIE ALIMENTARI PER CONTENERE L'USO DI ANTIBIOTICI NEL SUINO

Paolo Trevisi.....43

INFLUENZA DELLE DIFFERENTI PATOLOGIE SULL'INDICE DI CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI. RIDUZIONE DELL'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI ATTRAVERSO LA VACCINAZIONE

Vidal Heras A......45

ATTI DEL XLIII MEETING ANNUALE Reggio Emilia, 16-17 Marzo 2017

PIÙ PRODUTTIVITÀ E MENO ANTIBIOTICI? YES, WE CAN! PARTE II

ANTIBIOTICORESISTENZA IN MEDICINA UMANA: DIMENSIONI DEL PROBLEMA E STRATEGIE DI INTERVENTO

Castelli F., Mangioni D.49

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XLIII Meeting Annuale, Reggio Emilia, 16-17 Marzo 2017.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2017.

ISBN 978-88-903311-9-0

LA SALUTE ANIMALE È LA BASE PER RIDURRE L'USO DEGLI ANTIBIOTICI E COMBATTERE L'ANTIBIOTICORESISTENZA: LA PROSPETTIVA EUROPEA <i>Ricci A.</i>	51
---	----

EPIDEMIOLOGIA INTERSPECIFICA DELLE ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN SUINICOLTURA: MRSA E SANITÀ PUBBLICA <i>Sala V.</i>	55
---	----

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

POPOLAZIONE MICROBICA NEI CEREALI: INDAGINE SU DIFFERENTI TIPI DI CEREALI PROVENIENTI DA DIVERSE AREE GEOGRAFICHE <i>Bazzoli A., Bravo De Laguna F., Brune F., Couture V., Saornil D.</i>	61
--	----

RELAZIONE TRA STATO CORPOREO DELLA SCROFA E SUE PERFORMANCE: UNO STUDIO PRELIMINARE <i>Avanzini C., Corino C., Rossi R., Superchi P., Sabbioni A.</i>	69
--	----

ULCERE GASTRICHE NEL SUINO PESANTE ITALIANO: RILEVAZIONI AL MACELLO E IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO <i>Bottacini M., Gottardo F., Scollo A.</i>	81
---	----

EFFETTI SULLA MORTALITÀ NEONATALE DELL'UTILIZZO DI TRE DIFFERENTI TIPOLOGIE DI GABBIE PARTO (STUDIO PRELIMINARE) <i>Mazzoni C., Scollo A., Bertocchi M., Parmigiani E., Bresciani C.</i>	91
---	----

VALUTAZIONE DI DUE DIFFERENTI APPROCCI ANTIBIOTICI AL CONTROLLO DI MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO (SRD) IN SUINI IN SVEZZAMENTO <i>Scollo, A., Gottardo, F., Mazzoni, C.</i>	97
--	----

LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI MULTI-RESISTENTI DI <i>BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE</i> RIVELA LA PRESENZA DI UN NUOVO GENE RESPONSABILE DI RESISTENZA VERSO I LINCOSAMIDI <i>De Luca S., Cucco L., Massacci F.R., Magistrali C.F., Perreten V.</i>	103
---	-----

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN <i>E. COLI</i> ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI SUINI A CICLO CHIUSO: INTERFACCIA ANIMALI-UOMO-AMBIENTE <i>Cibin V., Drigo M., Tiengo A., Antonello K., Mancin M., Losasso C., Ricci A.</i>	111
--	-----

VALUTAZIONE DELLA MIC (MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION) DI CEPPI DI <i>MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE</i> E <i>MYCOPLASMA HYORHINIS</i> ISOLATI NEL SETTORE SUINICOLO ITALIANO <i>Catania S., Moronato M. L., Flaminio B., Ustulin M., Vio D., Gobbo F.</i>	119
---	-----

<i>ESCHERICHIA COLI</i> ENTEROTOSSIGENI ISOLATI IN FOCOLAI DI PWD IN ITALIA, BELGIO-OLANDA E SPAGNA: PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA <i>De Lorenzi G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Marzani K., Dottori M., D. Torri, Pangallo G., Luppi A.</i>	125
---	-----

IMMUNOCRITO: UN NUOVO STRUMENTO PER LA VALUTAZIONE DELLA CORRETTA COLOSTRATURA (TRASFERIMENTO DELLE IMMUNOGLOBULINE MATERNE) DEI SUINETTI <i>Sandri G., Bresaola M., Giovanardi D., Perini F.</i>	133
--	-----

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENOTIPI EUROPEI DEL VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN ITALIA TRA IL 2013 E 2016 <i>Fusaro A., Zamperin G., Milani A., Schivo A., Monne I., Cavicchio L., Vio D., Schiavon E., Giorgiutti M., Castellan A., Mion M., Beato M.S.</i>	139
---	-----

CASI CLINICI

IMPORTANZA DEL BILANCIO ELETTROLITICO DEB DELLA SCROFA DURANTE LA LATTAZIONE <i>Bresaola M., Vincenzi R., Giovanardi D., Perini F., Sandri G.</i>	147
--	-----

EFFICACIA DI UN VACCINO INATTIVATO BIVALENTE CONTRO CL. DIFFICILE E CL. PERFRINGENS DI TIPO A <i>Nigrelli A.D., Lombardi G., Faccini S., Caleffi A., Bardini R., Franzini G., Rosignoli C.</i>	153
--	-----

ZOPPIE IN ANIMALI IN MAGRONAGGIO E INGRASSO DOVUTE A INFEZIONE DA <i>MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE</i> <i>Ustulin M., Moronato M.L., Giorgiutti M., Catania S., Gobbo F., Vio D.</i>	155
--	-----

ABORTI NELLA FASE FINALE DELLA GESTAZIONE <i>Guadagnini G., Salvini F., Ottolini F. Paoletti F.</i>	159
--	-----

MORTALITÀ DA PLEUROPOLMONITE DA <i>ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE</i> IN SUINETTI SOTTOSCRFOA <i>Ustulin M., Giorgiutti M., Tagliente D., Targhetta C., Pierasco A., Conedera G., Vio D.</i>	163
---	-----

DESCRIZIONE DI ALCUNI CASI DI STEATOSI EPATICA ED IPOCALCEMIA NEL PERIPARTO <i>Fusco L., Trogu E.</i>	167
--	-----

GESTIONE DI UN FOCOLAIO DI LEPTOSPIRA SEROVAR POMONA IN UN SITO 1 <i>Nigrelli A.D., Rosignoli C., Faccini S., Franzini G., D'Incau M., Alborali L.</i>	173
---	-----

INFEZIONE CONGENITA DA POX VIRUS IN DUE SUINETTI <i>De Lorenzi G., Raffi V., Gibelli L., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A.</i>	175
--	-----

ENCEFALOMIOCARDITE IN UN ALLEVAMENTO DA RIPRODUZIONE: FORMA RIPRODUTTIVA E MORTALITA' IN SCROFETTE <i>Lazzaro M., Giacomini E., Scali F., Salogni C., Giovannini S., Pizzoni G., Grazioli S., Gibelli L., Nigrelli A., Alborali G.L.</i>	179
---	-----

POSTERS

RIDUZIONE CLINICA DELLA SALMONELLA ATTRAVERSO L'USO DEL <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> (MIYA-GOLD® S) <i>Kunstmann L., Bach J., Meedom L., Hautekiet V., Mondin P.</i>	187
---	-----

L'AGGIUNTA DI <i>CLOSTRIDIUM BUTYRICUM</i> (MIYA-GOLD® S) NEI SUINI COME BENEFICIO NELLA CONVERSIONE ALIMENTARE E NELL'ACCRESIMENTO MEDIO GIORNALIERO <i>Kunstmann L., Bach J., Meedom L., Hautekiet V., Mondin P.</i>	189
---	-----

EFFETTO DELL'ARPAGOSIDE SUL BURST RESPIRATORIO DEI NEUTROFI-
LI DI SUINO

Mosca F., Marruchella G., Mariani F., Tiscar PG.....191

INDAGINE SULLE PERDITE PRE- E POST-MACELLAZIONE: IL CASO DI UN
MACELLO DI SUINI PESANTI

Nannoni E., Liuzzo G., Serraino A., Giacometti F., Martelli G., Sardi L., Vitali M.,
Romagnoli L., Moscardini E., De Lucia A., Ostanello F.....197

ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEU-*
MONIAE E *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLATI NEL SUINO NEL PERIODO
2002-2016 IN ITALIA

Pangallo G., Bonilauri P., Gherpelli Y., Dottori M., De Lorenzi G., Luppi A.209

IMPIEGO DEI SOTTOPRODOTTI DELLA MACELLAZIONE DEI SUINI NEL-
LA RICERCA BIOMEDICA

Perrone V., Gonzalez O., Di Marco A., Cito G.219

APPLICAZIONE DI PROTOCOLLI VACCINALI PER IL CONTROLLO DI *SAL-*
MONELLA TYPHIMURIUM VARIANTE MONOFASICA NELL'ALLEVAMENTO
SUINO

Ruggeri J., Chirullo B., Drumo R., Pesciaroli M., Martinelli N., Scaglione F.E.,
Pregel P., Ammendola S., Lazzaro M., Giacomini E., Ossiprandi MC., Corradi A.,
Battistoni A., Bollo E., Pasquali P., Alborali G.L.223

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI PROSTAGLANDINE NEL POST-
PARTUM: RISULTATI PRELIMINARI SUI SEGNI CLINICI DELLA SCROFA

Scollo A., Trogu E., Casappa P., Mazzoni C.229

PREMIO GUADAGNINI 2017

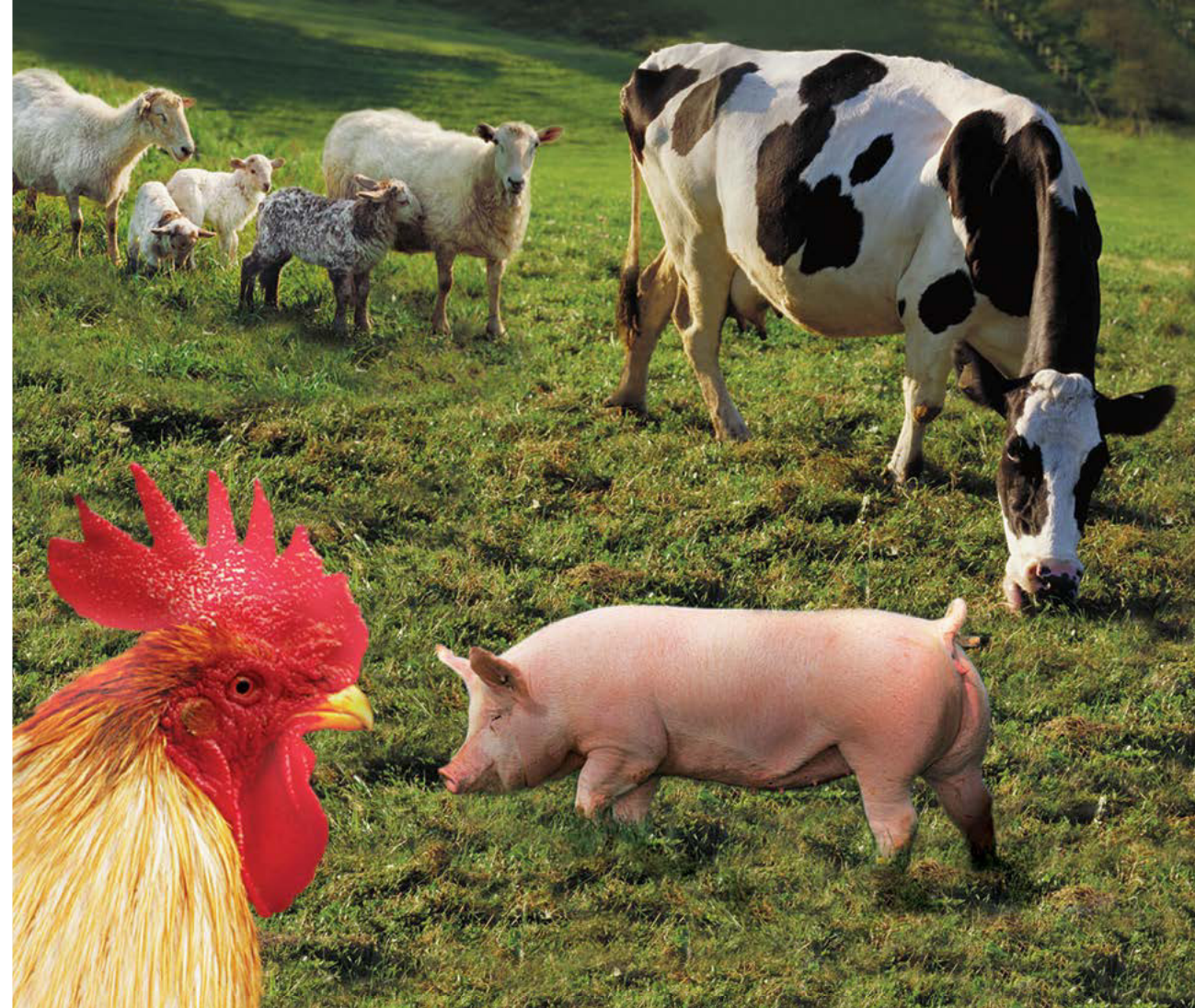
ALLEVAMENTO E MACELLAZIONE DEL SUINO PESANTE: CORRELAZIO-
NE TRA LA QUALITÀ DELLA CARNE E IL GRADO DI BENESSERE

Bacchi R., Nannoni E., Sardi L., Bertolini A., Borciani M., Gastaldo A., Gorlani E.,
Rossi A.237

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2017

EPIDEMIOLOGIA E GENOTIPI DI *TOXOPLASMA GONDII* NEL CINGHIALE E
IN SUINI DA ALLEVAMENTI CONVENZIONALI

Villa L., Gazzonis A.L., Manfredi M.T.255



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



Miliardi di suinetti

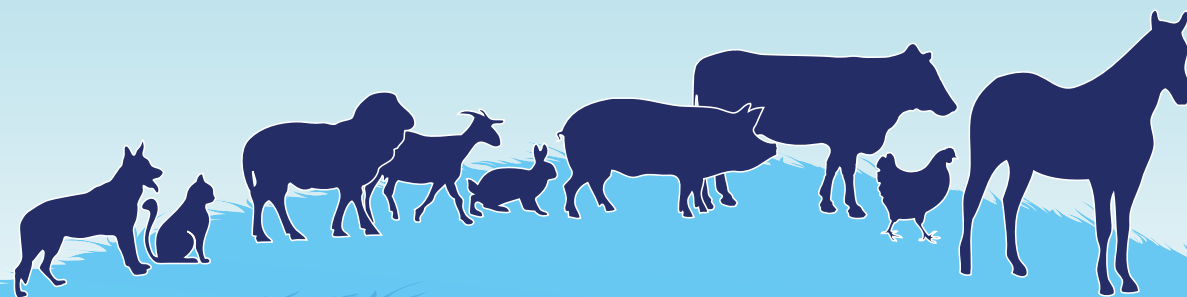
protetti da Circovirus

PREVENTION WORKS
Shaping the future of swine health



CALIER

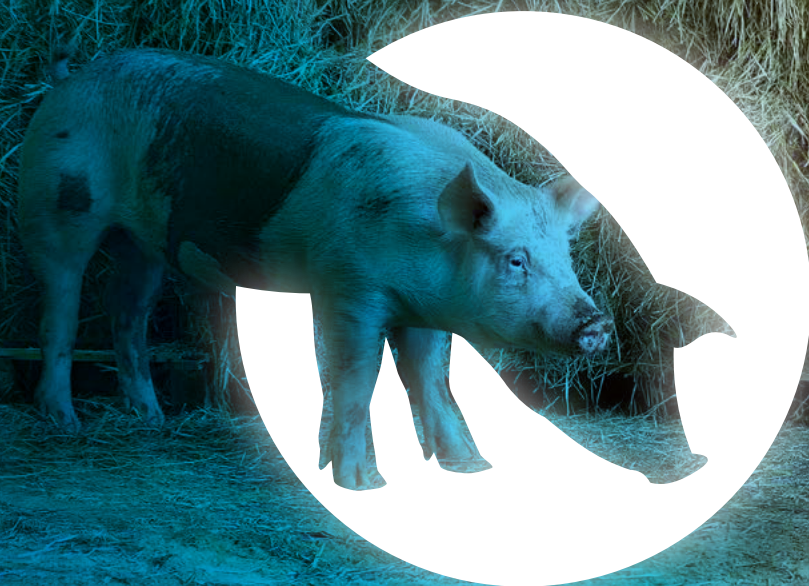
Committed to animal welfare



UN'IMPRESA DEL **GRUPPO INDUKERN**



Un nuovo
punto di riferimento
per il futuro...



Materiale riservato ai Sig. Medici Veterinari Farmacisti

Un range sempre più completo al tuo fianco:
Vaccini contro la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino,
il Mal Rossino, la Parvovirosi del suino,
la malattia associata al Circovirus,
la Pleuropolmonite del suino
e la Polmonite Enzootica

Together, beyond animal health



*Il tuo partner in
Terapia Veterinaria
e Nutrizione Animale*



Distributore esclusivo per l'Italia



*Italian pharmaceutical
company since 1976*



Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - ITALY
Tel. +39 0543 796464 - Fax +39 0543 796479
e-mail: info@chemifarma.it - www.chemifarma.it



MAY 2008 0422304

Produzione e commercializzazione
di farmaci veterinari in tutto il mondo

mtb
solutions



Dal 2014 presente anche in Italia

© Dechra Veterinary Products
Via Agostino da Montefeltro 2
10134 TORINO - ITALIA
Tel. +39 0113157437
Fax +39 0113157311

info.it@dechra.com

maggiori informazioni e materiali didattici su
www.dechra.it


Dechra
Veterinary Products



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.

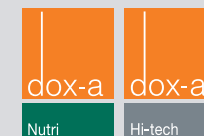
Avere cura è molto più che curare.

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**

Ecuphar Italia S.R.L.
Viale Francesco Restelli, 3/7, piano 1
20124 Milano (Italia)

PREFAZIONE

Cari soci,

è tradizione che il volume degli atti abbia un'introduzione scritta da qualche membro del Consiglio direttivo. In genere l'accento viene posto sulle attività della Società, sulla suinicoltura, sugli argomenti del Meeting, ecc.

Quest'anno, l'introduzione è stata condivisa da tutti i membri del Consiglio Direttivo, tentando di individuare qualche spunto di discussione che vorremmo condividere con tutti voi.

Abbiamo la sensazione che, in questi anni, la SIPAS sia profondamente cambiata riflettendo, probabilmente, quanto è accaduto nella suinicoltura e, più in generale, nella professione veterinaria. Forse è il caso di prendere atto che una parte consistente ed importante della suinicoltura italiana (gli allevatori) sia sostanzialmente scomparsa dalla SIPAS, che la gran parte dei contributi scientifici si sia orientata verso contenuti relativi alle malattie trasmissibili e che il contributo che arriva dalle Università si sia progressivamente ridotto fino quasi ad azzerarsi.

Crediamo sia importante capire perché sia successo ciò anche se possiamo solo avanzare alcune ipotesi.

La SIPAS nasce nel 1974 come una delle poche società scientifiche in ambito veterinario che promuove la collaborazione con altre figure professionali del mondo produttivo. Crediamo che questa sia stata una importante intuizione da parte dei soci fondatori. Nelle intenzioni, la SIPAS doveva essere la "casa comune" di chi si occupava non solo di patologia ma anche di allevamento dei suini. La riduzione del contributo di una parte importante di questo mondo produttivo penalizza fortemente la vita e le attività della Società. A questo fenomeno potremmo dare un'interpretazione semplicistica: in questi anni gli allevatori, che nel frattempo si sono ridotti di numero, avevano qualcosa di più importante da fare che partecipare alla vita della SIPAS. Francamente non crediamo che la spiegazione stia in questi termini. Crediamo invece che la loro "scomparsa" sia da ricercare nella progressiva riduzione, da parte della SIPAS, della capacità di parlare la stessa lingua degli allevatori, di coinvolgerli attivamente nella vita della Società, di individuare argomenti e discussioni che interessino anche a loro e non solo al veterinario aziendale.

Il progressivo spostamento di attenzione verso argomenti di tipo infettivistico è invece il risultato di due componenti diverse ma strettamente correlate: una legata a ragioni "storiche" di emergenza o ri-emergenza di "nuove" patologie trasmissibili (PRRS, PMWS, Influenza, PED, ecc.) l'altra correlata al peso crescente di chi, professionalmente, si occupa di questo tipo di problemi, *in primis* gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali.

Lasciamo volutamente per ultimo il ruolo dell'Università perché è quello più complesso, apparentemente meno interessante ma che, sul lungo periodo, potrebbe rappresentare il problema più rilevante. L'attuale sistema di selezione per l'accesso al corso di laurea in Medicina Veterinaria, alcune scelte scellerate interne all'Università e il tentativo di adeguamento a standard europei che non si adattano pienamente alla tradizione culturale italiana hanno fatto sì che, nella stragrande maggioranza dei casi, gli interessi professionali del giovane laureato siano rigidamente orientati verso la

clinica degli animali d'affezione, con poca attenzione verso il mondo zootecnico, della produzione e della trasformazione. Questo porterà, verosimilmente, ad una riduzione del peso della componente veterinaria in questi settori e aprirà la strada ad altre figure professionali. Se a tutto questo si aggiunge il fatto che una comunicazione presentata alla SIPAS ha un peso nullo sulla valutazione della produttività scientifica dei docenti (ovvero produce "impact" ma non "impact factor"), è possibile spiegare perché i contributi, su questo fronte, si siano progressivamente ridotti.

In oltre 40 anni di attività, la SIPAS ha sempre dimostrato di possedere, al suo interno, le capacità necessarie a riconoscere i cambiamenti e la forza per governarli. Ci piace pensare che questi talenti non solo siano ancora presenti, ma che possano essere efficacemente utilizzati per progettare nuove attività e nuovi rapporti con chi si occupa di suinicoltura, a qualsiasi livello. Come Consiglio Direttivo riteniamo che la SIPAS debba consolidare il proprio ruolo culturale nel panorama suinicolo italiano. Per raggiungere questo obiettivo è però necessario ragionare, progettare e scegliere in anticipo quale sarà la strada da percorrere nei prossimi anni. Per questo vi chiediamo, cari Soci, un contributo costruttivo che permetta a tutti, partendo dalla valutazione di quello che siamo oggi, di decidere cosa ci piacerebbe che la SIPAS diventasse domani.

Ovviamente non abbiamo la pretesa di aver individuato (e spiegato) correttamente tutte le criticità. La nostra intenzione era solo quella di sollevare una discussione perché crediamo fermamente, come aveva già scritto Andrea Luppi l'anno scorso, che solo dal continuo confronto, aperto alla discussione, si può ambire ad una costante crescita professionale e ad un ampliamento delle conoscenze.

Da ultimo, un ringraziamento particolare va a tutti i Soci, alla Segreteria Delegata e agli Sponsor. Tutti hanno, con ruoli diversi, generosamente supportato la SIPAS.

Giovanni Loris Alborali
Giampietro Sandri
Fabio Ostanello
Annalisa Scollo
Michele Drigo
Francesco Salvini
Silvio Zavattini

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

“CASI CLINICI IN SUINICOLTURA: PRRS E NON SOLO”

Parma, 7 Ottobre 2016

UN EPISODIO PARTICOLARMENTE GRAVE DI ENCEFALOMIOCARDITE (EMCV) IN SUINETTI DI SVEZZAMENTO (LO STRANO CASO DEI SUINETTI MORTI ALL'IMPROVVISO IN SVEZZAMENTO)

SANDRI G.P.¹, ALBORALI G.L.², CORRADI A.³, CANTONI A.M.³, GIOVANARDI D.⁴

¹ *Agricola Tre Valli, Quinto di Valpantena; Verona,*

² *IZSLER, Sez. Diagnostica Brescia,*

³ *Dipartim. Scienze Animali – Facoltà di Med.Veterinaria Università di Parma,*

⁴ *Laboratorio Tre Valli, San Martino Buon Albergo; Verona Italy*

INTRODUZIONE

L'Encefalomicardio Virus (EMCV) appartiene alla famiglia *Picornaviridae*, genere *Cardiovirus*. Questo virus è diffuso praticamente in tutto il mondo e la sintomatologia clinica indotta interessa principalmente e più frequentemente soggetti giovani sebbene, come patogeno, possa occasionalmente indurre malattia anche in soggetti adulti o essere causa di problemi di infertilità. Questo caso clinico descrive un caso di Encefalomicardite particolarmente grave che ha causato mortalità elevata in suinetti svezzati e dove i suinetti stessi hanno agito come moltiplicatori del virus aumentando così il “viral load” ambientale.

Descrizione del caso

L'allevamento interessato era un sito 2 di svezzamento servito da una piccola scrofaia con produzione in bande tri-settimanali di circa 800-900 suinetti svezzati. La scrofaia di origine dei suinetti era un allevamento ad elevato stato sanitario negativa per Malattia di Aujeszky, PRRS, Enterite Necrotica, APP ma positiva M. hyo. I suinetti alla svezzata avevano un'età media di 24-28 giorni e pesavano 6,6-7,2 kg. All'arrivo in svezzamento ricevevano un mangime medicato con amoxicillina + colistina generalmente per non più di una settimana. Durante la loro permanenza in svezzamento non ricevevano alcuna vaccinazione. Trattamenti individuali o di gruppo alla bisogna. Dieci giorni prima dello spostamento all'ingrasso ricevevano trattamento endectoparassitico nel mangime per 7 gg. Questo svezzamento lavorava come ciclo continuo ricevendo suinetti ogni 21 giorni per cui solitamente erano presenti in contemporanea altri due gruppi di suinetti svezzati. L'allevamento è composto da tre reparti adiacenti che lavorano in TP/TV per reparto. Ognuno dei tre reparti ha circa 29-30 box, ciascuno della capacità di 25-30 capi. Due dei reparti hanno grigliato in cemento mentre il terzo ha grigliato in plastica. Ventilazione ad aria «semi-naturale». L'igiene e la gestione degli ambienti può essere considerata di livello medio-alto. Fino a circa metà novembre 2011 i risultati tecnici e produttivi erano sempre stati mediamente più che buoni con perdite ben al di sotto del 3-4% e solo occasionalmente si manifestavano problematiche di Streptococchi (Str. Suis) ben controllate con trattamenti a base di amoxicillina. All'improvviso – circa a metà novembre 2011 – l'allevatore chiama riferendo della morte improvvisa, senza sintomi apparenti, di alcuni suinetti tra i più belli del gruppo più vecchio. L'esame necroscopico non evidenziava lesioni macroscopiche di rilievo e anche le prime indagini di laboratorio escludevano la presenza di Str. Suis. La PCR e la sierologia confermavano che l'allevamento era ancora negativo per PRRS e Aujeszky. Nei giorni successivi prosegue lo stillicidio di soggetti morti – alcuni dei quali con sintomi di tipo nervoso – per cui si decide di portare altro materiale in Laboratorio e contemporaneamente si

inizia una terapia a base di amoxicillina in acqua di bevanda. Purtroppo nonostante la terapia la mortalità proseguiva con la perdita di soggetti belli, asintomatici che morivano all'improvviso. Da questi soggetti furono evidenziate lesioni di necrosi del miocardio (Foto 1.) che hanno indirizzato la diagnosi verso la infezione da EMCV come possibile causa.



Foto 1. Necrosi focale basofila del miocardio da Encefalomicardiovirus

Nei giorni seguenti furono consegnati all' IZSLER sede di BS 8 suinetti e/o i loro organi e il sospetto di diagnosi di encefalomiocardite fu confermato per mezzo di una specifica PCR e anche da coltura cellulare. Nei giorni seguenti, mentre l'Università di Parma conduceva indagini istologiche sul cervello e sui cuori di soggetti morti, in allevamento venivano raccolti campioni di feci e urine da altri soggetti trovati morti nei box. Dieci campioni di feci e tre campioni di urine risultarono positivi sia alla PCR che in coltura cellulare. Gli esami istologici condotti dal laboratorio di anatomia patologica dell'Università di Parma misero in rilievo lesioni petecchiali diffuse al miocardio ventricolare indicative di gravi lesioni miocardiche. Gravi lesioni istologiche furono anche rilevate nei cervelli dei soggetti inviati (Foto 2). Nonostante tutti gli sforzi fatti per controllare/limitare la diffusione dell'infezione la mortalità nel gruppo A - i soggetti più vecchi presenti in svezzamento – progredì fino al 25%. Nei due gruppi più giovani le perdite arrivarono rispettivamente al 18% e al 2,1 % rispettivamente quando fu presa la decisione di svuotare completamente tutto il sito di svezzamento.

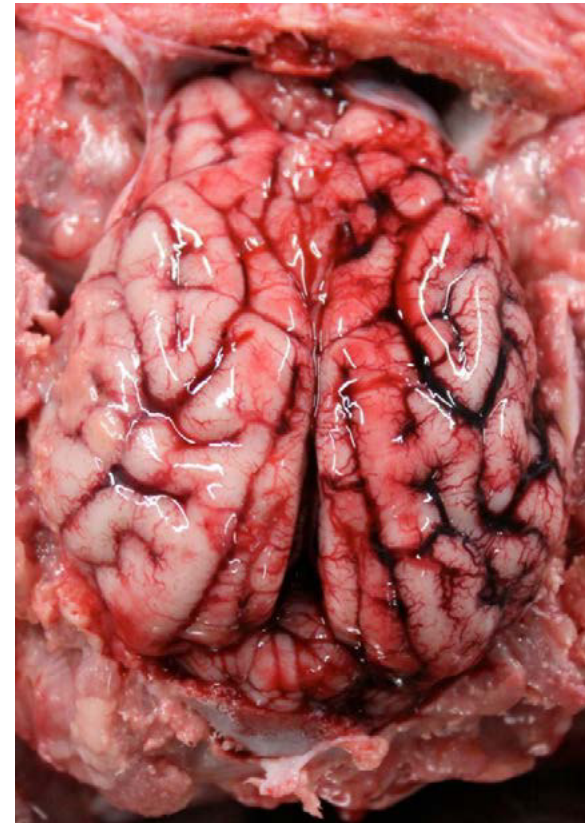


Foto 2. Congestione venosa dell'emisfero cerebrale destro

DISCUSSIONE

Nonostante in letteratura venga riportato che sono i topi i portatori/diffusori dell'infezione, il rilevamento di EMCV nelle feci e nelle urine di suinetti morti e moribondi trovati in allevamento ci ha confermato nella convinzione che anche alcuni soggetti/suini abbiano agito quali moltiplicatori/diffusori del virus prima della morte. Questa ipotesi sarebbe confermata anche dall'andamento della mortalità che interessava in modo particolare box contigui. A causa dell'elevata contaminazione ambientale creata e dell'impossibilità di controllare la mortalità si decise di svuotare completamente il sito inviando anche i suini più giovani – sebbene non in età – ad un sito di ingrasso esterno. In seguito tutti gli ambienti furono completamente sanificati utilizzando una particolare procedura di "thermo-fogging". Sebbene in allevamento non si fosse rilevata – paradossalmente – una grande infestazione di topi (tracce, escrementi o soggetti morti) furono ulteriormente rafforzate tutte le procedure di derattizzazione all'interno e all'esterno del sito. Dopo un fermo sanitario di un'ulteriore settimana il sito ricevette un nuovo gruppo di suinetti svezzati che non ebbero alcun problema.

BIBLIOGRAFIA

Diseases of Swine 8th edition. Iowa State University Press / Ames, Iowa U.S.A.

MAL ROSSINO IN SUINETTI SOTTOSCroFA

PELLACINI M.¹, CANELLI E.², LUPPI A.³

¹ *Veterinario Ferrero Mangimi*

² *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Parma*

³ *IZSLER*

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è la descrizione di un caso di mal “rossino” acuto verificatosi in suinetti di 20-25 giorni d’età appartenenti ad un allevamento a ciclo chiuso di 180 scrofe. Il mal “rossino” è una malattia infettiva che può decorrere in forma acuta, sub-acuta o cronica causata da *Erysipelothrix rhusiopathiae*, del quale ne esistono 28 sierotipi. Pur essendo il suino il bersaglio elettivo dell’infezione, generalmente causata dai sierotipi 1a, 1b e 2 (Opriessnig and Wood, 2012), questa presenta uno spettro d’ospite ampio potendo infettare altre 30 specie aviarie, 50 specie di mammiferi, numerose specie ittiche e l’uomo. *E.rhusiopathiae* è un batterio Gram positivo che cresce dopo 48 ore dalla semina di materiale patologico su terreni solidi a base di sangue o di siero. Pur essendo un germe aerobio facoltativo, alcuni ceppi crescono meglio in coltura se incubati in camere climatiche caratterizzate da atmosfera arricchita con 5-10% di CO₂.

Il suino si comporta come reservoir dell’infezione potendo albergare *E.rhusiopathiae* a livello di tonsille e cripte ghiandolari della valvola ileo-cecale, senza presentare sintomatologia ed eliminando il virus attraverso secreti oro-nasali e feci. Gli animali con forma clinica acuta eliminano il germe mediante feci, urine, saliva e secreti nasali. La contaminazione degli ambienti con materiale infetto presenta un fattore di rischio molto importante per il mantenimento e diffusione dell’infezione anche grazie all’elevata resistenza di *E.rhusiopathiae* nell’ambiente.

La gravità della forma clinica dopo l’infezione è modulata da diversi fattori, come la virulenza del ceppo di *E.rhusiopathiae* coinvolto e l’età degli animali (suini di età inferiore a 3 mesi sembrano essere meno sensibili all’infezione in virtù della protezione conferita dell’immunità colostrale).

Fattori predisponenti per lo sviluppo della forma clinica acuta sono gli sbalzi termici, fenomeni stressanti, come ad esempio il trasporto, cambi di alimentazione ed infezioni virali con azione immunodepressiva.

La forma acuta assume carattere setticemico, con febbre alta (42°C), anoressia, stipsi, cianosi delle mucose e talora vomito. Caratteristiche sono le chiazze cutanee di colore rosso-viola, interessanti i padiglioni auricolari, collo, ascelle, l’addome e piatto interno delle cosce. Circa il 20-40% dei suini colpiti da questa forma vanno incontro a morte. Nelle scrofe non è infrequente osservare aborto, mentre i suinetti sottoscrofa possono essere colpiti da forme setticemiche.

La forma sub-acuta, sempre a carattere setticemico, è caratterizzata da minor gravità rispetto alla forma precedente e si manifesta con la comparsa delle caratteristiche lesioni rossastre a losanga con tendenza a confluire occupando ampie aree cutanee. La guarigione è più frequente e rapida della forma acuta, sebbene talvolta tenda a cronicizzare (Cavirani, 2013). La forma cronica, che come accennato è l’evoluzione delle forme acute non letali e sub-acute, si manifesta soprattutto con artriti croniche che compaiono circa 3 settimane dall’esordio del focolaio e da endocarditi valvolari cosiddette ulcero-polipose (Wang et al., 2010).

La diagnosi, sul piano clinico, è agevole soprattutto nelle forme sub-acute e croniche con la presenza delle caratteristiche lesioni cutanee, articolari ed endocardiche. Nelle forme

acute, dove i quadri sono comuni ad altre malattie setticemiche, i sintomi e le lesioni osservate sono compatibili con altre malattie batteriche sostenute da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis* e *Salmonella choleraesuis*. La diagnosi definitiva necessita l'isolamento del patogeno che si ottiene da diversi tessuti (ad es. rene, milza, polmoni, cervello) impiegando comuni terreni colturali. L'identificazione dell'isolato avviene attraverso la valutazione morfologica delle colonie, esame microscopico dopo colorazione di Gram ed appropriate prove biochimiche. Attualmente la diagnosi diretta può essere ottenuta con la PCR, direttamente su tessuti patologici o come strumento per l'identificazione degli isolati. La diagnosi indiretta, attraverso l'impiego della sierologia (test ELISA), può essere utilizzata come monitoraggio o nella valutazione dell'immunità post-vaccinale piuttosto che a scopo diagnostico (Cavirani, 2013). *E.rhusiopathiae* è generalmente sensibile ad una vasta gamma di antibiotici compresa la penicillina che costituisce la terapia d'elezione in casi di mal rossino. Tuttavia, il principale strumento di prevenzione della malattia è rappresentato dalla vaccinazione, impiegando vaccini inattivati generalmente contenenti il sierotipo 2. Questa, considerata strategica soprattutto nei riproduttori, prevede un primo intervento di sensibilizzazione, un richiamo (che segue la prima vaccinazione di 3-5 settimane) e successivi richiami periodici intervallati da non oltre 6 mesi. I richiami periodici sono necessari in quanto l'immunità creatasi dopo gli interventi di sensibilizzazione e richiamo conferiscono un'immunità di durata da 2 a 6 mesi (Cavirani, 2013).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico oggetto del presente lavoro si è verificato in una azienda a ciclo chiuso di 180 scrofe con gestione dei parti a 5 settimane. L'azienda effettuava rimonta interna con età di svezzamento dei suinetti a 26 giorni. In sala parto era presente una pavimentazione in grigliato di plastica e la ventilazione era forzata a pressione negativa. Il piano vaccinale è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano vaccinale e trattamenti.
Table 1. Vaccinations schedule.

Programma vaccinale suinetti	Mhyo+PCV2 (a 3 settimane) + PRV
Programma vaccinale scrofette	Mhyo+PCV2 (a 3 settimane) + PRV + PPV + <i>E.rushiopathiae</i> (2 interventi)
Programma vaccinale scrofe	PRV (3 interventi/anno) + SIV (2 interventi/anno)

Legenda: PCV2 (*Circovirus* suino tipo 2); Mhyo (*Mycoplasma hyopneumoniae*); PRV (Virus della Malattia di Aujeszky); SIV (Virus influenza suina); PPV (*Parvovirus* suino)

Il caso clinico che andiamo a descrivere ha fatto il suo esordio coinvolgendo sette scrofe in gestazione, le quali hanno presentato anoressia e la presenza di losanghe cutanee, di colore rossastro, leggermente rilevate e con tendenza a confluire. Le scrofe colpite dalla forma cutanea appena descritta non presentavano altri sintomi di rilievo o fenomeni di aborto. Quindici giorni dopo la comparsa della sintomatologia nelle scrofe, in suinetti di 10-25 giorni d'età appartenenti a 10 nidiata (per ogni nidiata circa il 20-30% dei suinetti colpiti) è stata osservata anoressia, letargia, febbre (41°C), grave iperemia cutanea ed elevata mortalità (letalità del 50%).

Cinque suinetti deceduti con i quadri clinici appena descritti sono stati sottoposti a necropsopia. I quadri anatomopatologici salienti erano caratterizzati da grave iperemia cutanea, linfadenomegalia generalizzata, presenza di lacinie fibrinose in peritoneo, splenomegalia, edema polmonare e petecchie emorragiche a livello della corticale renale. Le diagnosi differenziali prese in considerazione comprendevano: salmonellosi (*S.choleraesuis*), streptococchi (*S.suis*), setticemia da *Actinobacillus suis*, PDNS (porcine dermatitis and nephropathy syndrome), peste suina classica e mal rossino (*E.rhusiopathiae*). Durante la necropsopia sono stati prelevati campioni di tessuto provenienti da cute, cervello, polmoni, stomaco, intestino, milza, fegato e reni. Le porzioni di tessuto sono state fissate in formalina al 10% ed utilizzate per indagini istopatologiche. Rene e milza sono stati sottoposti ad esame batteriologico impiegando metodi standardizzati (semina su Hektoen agar e agar siero). Le piastre seminate con materiale patologico sono state incubate a 37°C per 48 ore. In tabella 2 sono riassunte tutte le indagini di laboratorio condotte.

Tabella 2. Indagini di laboratorio.
Table 2. Laboratory investigations.

Campione prelevato/materiale	Indagine di laboratorio
Cervello, Milza, Rene	Esame batteriologico, valutazione della morfologia, colorazione di Gram e esame microscopico, test biochimici: ossidasi, catalasi, TSI (Triple Sugar Iron).
Tessuti ed isolato batterico	PCR per <i>Erysipelothrix spp.</i> (Makino et al., 1994)
cute, cervello, polmoni, stomaco, intestino, milza, fegato e reni	Istopatologia
Isolato batterico (<i>Erysipelothrix spp.</i>)	Antibiogramma

Dopo 24 ore d'incubazione su terreno agar sangue è stata osservata la crescita di colonie fini e non emolitiche, che a 48 ore mostravano un'emolisi debole, facilmente apprezzabile come una zona viridante circondante le colonie. Alla colorazione di gram ed esame microscopico le colonie batteriche apparivano costituite da cocchi gram positivi, negativi ai test della catalasi ed ossidasi mentre su TSI, dopo 24 ore d'incubazione, si osservava la caratteristica crescita del germe con produzione di H₂S. La morfologia delle colonie, sia macroscopica che microscopica e i risultati delle prove biochimiche indirizzavano la diagnosi eziologica verso una forma setticemica da *Erysipelothrix spp.*, confermata anche dai risultati positivi della PCR eseguita sui tessuti patologici e sull'isolato batterico. I quadri microscopici salienti osservati tramite l'esame istologico erano caratterizzati da microvasculite neutrofilica a livello di cute e sottocute, emorragie pluriviscerali e glomerulonefrite trombo-necrotica acuta. Sul ceppo di *Erysipelothrix spp.* isolato è stato eseguito l'antibiogramma con il metodo della disco diffusione (metodo Kirby-Bauer). In tabella 3 sono elencati gli antibiotici testati ed il risultato ottenuto.

Tabella 3: Risultati dell’antibiogramma sul ceppo di *Erysipelothrix spp.* isolato.
Table 3: Antibigram results performed on *Erysipelothrix spp.* strain isolated.

Antibiogramma (metodo Kirby-Bauer)	S/R
AMOXICILLINA	S
AMOXICILLINA+ ACIDO CLAVULANICO	S
AMPICILLINA	S
CEFALOSPORINA 1st GEN.	S
CEFALOSPORINA 2nd GEN.	S
CEFALOSPORINA 3rd GEN.	S
ENROFLOXACIN	R
FLORFENICOLO	S
LINCOMICINA	R
PENICILLINA	S
TETRACICLINA	R
TIAMULINA	S
TILOSINA	S
TRIMETROPRIM+SULFAMIDICO	R

Legenda: S (sensibile); R (resistente).

Alla comparsa della sintomatologia e considerata la gravità del fenomeno e l’elevata mortalità è stato approntato nei suinetti un trattamento antibiotico d’emergenza con enrofloxacin IM (5 mg/kg per 3 giorni), in attesa delle indagini di laboratorio. Il trattamento antibiotico non è risultato efficace nel ridurre la sintomatologia e le perdite e pertanto, alla luce dei risultati di laboratorio è stato modificato il protocollo terapeutico impiegando amoxicillina “long acting” IM (15 mg/kg, 2 interventi intervallati da 36 ore nei suinetti sintomatici e 1 intervento in quelli asintomatici ma a contatto). Le scrofe in gestazione e lattazione sono state sottoposte a trattamento antibiotico con amoxicillina nel mangime (900 ppm in gestazione e 600 ppm in lattazione) e nelle scrofe gestanti è stata eseguita una vaccinazione d’emergenza per mal rossino. Dopo l’entrata in vigore delle misure sopra elencate non si sono più osservati casi riferibili a mal rossino nell’allevamento.

DISCUSSIONE

Il caso clinico appena descritto riporta un episodio di mal rossino in suinetti sottoscrofa, evento piuttosto raro nell’allevamento suinicolo moderno. Un aspetto importante che merita un approfondimento è sicuramente relativo ai caratteri epidemiologici della malattia. *E.rhusiopathiae* è un germe ubiquitario ed il suino si comporta come reservoir dell’infezione potendo albergare *E.rhusiopathiae* a livello di tonsille e cripte ghiandolari della valvola ileo-cecale senza presentare sintomatologia ed eliminando il virus attraverso secreti oro-nasali e feci. In particolare, i secreti oro-nasali assumono notevole importanza nella trasmissione del patogeno considerando che il 30-50% dei suini asintomatici sono positivi a livello tonsillare

(Opriessnig and Wood, 2012). Data la grande diffusione di *E.rhusiopathiae* il principale strumento per il suo controllo in allevamento è l’impiego della vaccinazione nelle scrofe, che una volta immunizzate possono trasferire attraverso il colostro una solida immunità passiva ai suinetti proteggendoli verso la forma clinica della malattia. Il principale elemento da considerare, come fattore di rischio nell’insorgenza del focolaio descritto nel presente lavoro, è la mancata vaccinazione delle scrofe per mal rossino, lasciando completamente recettivi i suinetti privi di una solida immunità passiva. La malattia è tuttavia modulata da altri fattori come ad esempio la virulenza del ceppo batterico, la presenza di infezioni virali concomitanti a carattere immunodepressivo (ad es. PRRSV), fattori stressanti in genere (stress termico, cambi di alimentazione, stress da trasporto) e ultimo, ma non per importanza, il rispetto delle norme igieniche, di pulizia e disinfezione richieste dai protocolli di biosicurezza interna. Infatti, sebbene sia sensibile alla maggior parte dei disinfettanti, *E.rhusiopathiae*, quando protetto da materiale organico risulta difficilmente aggredibile. *E.rhusiopathiae* mostra inoltre una considerevole resistenza a condizioni ambientali estreme come ad esempio l’essiccamento o il congelamento rimanendo vitale per mesi a temperature intorno ai -20°C e alle basse temperature in genere (Wang et al., 2010).

Fig. 1. Suinetto di 15 gg di vita. Iperemia e cianosi cutanea.
Fig. 1. Piglet 15days old. Cutaneous hyperemia and cyanosis.



BIBLIOGRAFIA

Cavirani P. (2013) “Mal rossino” in Martelli P. “Le patologie del maiale” Tabelle diagnosi differenziale. ed. Point Veterinaire Italie; 2013. p. 509-515.

Opriessnig T., Wood R.L. (2012) “Erysipelas” in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Scharzt K.J., Stevenson W. “Diseases of swine”, 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 750-757.

Wang Q., Chang B.J., Riley T.V. (2010) *Erysipelothrix rhusiopathia*. Veterinary microbiology 140, pp. 405-417.

SALMONELLA CHOLERAESUIS IN SUINETTI IN SVEZZAMENTO

SALVINI F.

PIGVET Brescia

INTRODUZIONE

Il caso clinico riportato, è apparso in un sito 2 di un allevamento di suini del nord Italia. L'azienda, di 1800 scrofe circa, è organizzata con 3 siti 2 esterni, mentre i siti 1 e 3 sono tutti nel medesimo allevamento. I siti 2, dalla capienza variabile da 1800 a 2500 suinetti, sono in prevalenza su paglia.

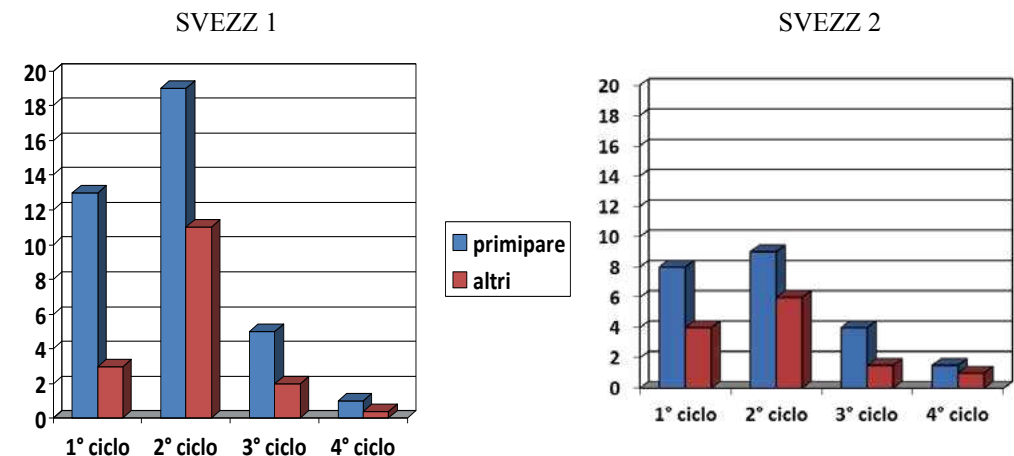
Nel novembre 2015, in uno svezzamento su paglia, è comparso un problema di mortalità e scarti, certamente riferibile ad una setticemia, con morbidità fino al 50% e mortalità del 20%.

Descrizione del caso

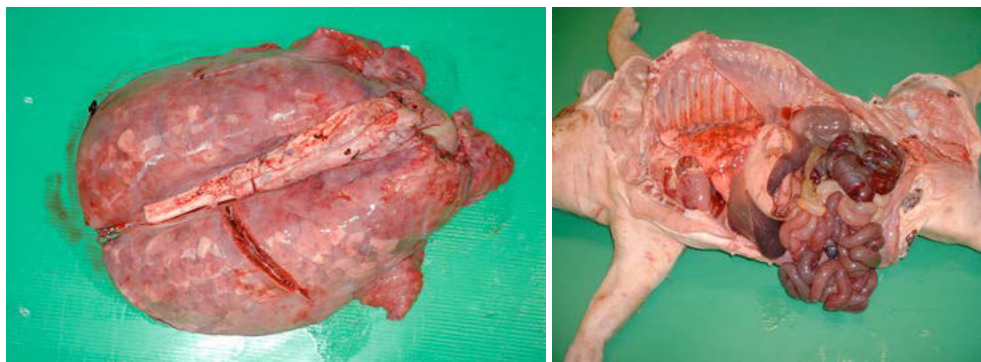
Il periodo di osservazione del caso va da novembre 2015 a luglio 2016, ed ha interessato suinetti in svezzamento allevati in siti 2 esterni all'azienda di origine. I suinetti, svezzati a circa 4 settimane di vita, venivano trattati con Amoxicillina IM in sala parto e con Amoxicillina, Colistina e Zinco per os la settimana successiva allo svezzamento. Per i successivi 10 giorni il mangime era medicato con Doxiciclina e Zinco.

Le scrofe erano vaccinate per Aujeszky e Prrs, 4 volte/anno a tappeto, le scrofette con 3 interventi di Aujeszky e 2 di Prrs prima della copertura, oltre a PPV, Mal Rosso e PCV2, mentre i suinetti venivano vaccinati per M. Hyopneumoniae a 5 e 25 giorni di vita, per PCV2 a 3 settimane di vita e per Aujeszky a 75 e 95 giorni di vita.

Nella fase iniziale il problema ha interessato principalmente i figli delle scrofe primipare, in particolare a circa 80 giorni di vita, e soprattutto dopo la 1° vaccinazione per malattia di Aujeszky. Nei cicli successivi tutto il gruppo era interessato, con segni clinici molto severi: ipertermia, depressione del sensorio, inappetenza, cianosi delle estremità. La risposta a trattamenti antibiotici, sia per via orale che parenterale, era scarsa e di breve durata. Anche per questo in un primo momento il sospetto era di una forma virale. Gli esami di laboratorio, effettuati sul sangue dei soggetti colpiti, non hanno evidenziato nulla di significativo, così come non è stata evidenziata una significativa differenza fra i figli delle scrofe primipare rispetto al resto del gruppo.



All'esame autoptico si evidenziava un quadro generale riferibile ad una setticemia, con iperplasia linfonodale diffusa, evidente splenomegalia e presenza sporadica di fibrina in cavità addominale. L'intestino mostrava contenuto liquido e giallastro in alcuni soggetti. Costante una ipertrofia del miocardio e broncopolmonite sul 50% dei soggetti osservati.



Il quadro di setticemia osservato, poteva essere riferibile a PCV2, Streptococcus suis, H. Parasuis, Prss, Salmonella Choleraesuis. Dagli esami di laboratorio effettuati su visceri e suinetti morti, è stata più volte isolata una Salmonella Choleraesuis.

Gli interventi successivi all'isolamento di S. Choleraesuis, hanno riguardato l'ambiente, trattamenti sia antibiotici che alimentari, ed una profilassi vaccinale. In particolare si è deciso di clorare l'acqua di abbeverata, di smaltire il liquame più lontano dai capannoni, di mettere del perfosfato sui pavimenti prima di stendere la paglia, e ed è stato applicato un diverso protocollo di disinfezione con rotazione dei disinfettanti.

Ai suinetti in sala parto, è stata sostituita l'amoxicillina IM con 3 interventi di Marbofloxacin fatti a 3-10 e 28 giorni di vita. Solo sulle primipare è stata introdotta una iniezione di Enrofloxacin al momento del parto.

Alle scrofe è stato aggiunto all'alimento un pool di monogliceridi negli ultimi 60 giorni di gestazione ed in lattazione, così come è stata aumentata l'acidificazione del mangime dei suinetti.

Dal luglio 2016 i suinetti allo svezzamento sono stati vaccinati con un vaccino stabulogeno per S. Choleraesuis.

Già dai primi interventi effettuati, la sintomatologia clinica si è ridotta drasticamente, come evidenziato nei grafici precedenti.

DISCUSSIONE

Durante la fase acuta del problema qualsiasi intervento di tipo farmacologico, non ha dato i risultati attesi. Questo aspetto è anche confermato dalla bibliografia, in cui l'aspetto gestionale è indicato come il principale strumento in grado di controllare questa patologia. Anche nel caso descritto gli interventi su ambiente e alimentazione uniti ad una buona profilassi, hanno fornito risultati soddisfacenti. S. choleraesuis è sicuramente una patologia primaria, non necessariamente correlata a forme virali. Va trattata come una setticemia, ed ha un comportamento molto diverso dalle altre forme di Salmonellosi. L'uso del vaccino stabulogeno sembra ridurre la sintomatologia oltre che negli svezzamenti, soprattutto nelle prime fasi di ingrasso.

CASO CLINICO: MORTALITÀ SOTTOSCroFA

BARDINI R.

Product Manager swine , Nutreco Italy

INTRODUZIONE

Spesso il veterinario od il tecnico si avvicinano ad un problema in allevamento con una idea preconstituita, spesso facendosi condizionare dalla esperienza passata o dai suggerimenti della proprietà, a volte senza rendersene perfettamente conto. Questo caso viene presentato per ricordare che la mortalità dei suinetti sottoscrofa non sempre si limita alle patologie batteriche o virali classiche, ma che esistono anche altre possibilità o cause che vanno in ogni modo tenute presenti ed approfondite, e che l'idea preconfezionata prima di visitare una azienda il più delle volte è errata.

ALLEVAMENTO ED INFORMAZIONI GENERALI

- Si tratta di una azienda di 2300 scrofe a ciclo aperto divisa in due strutture distinte da 700 e 1600 riproduttori rispettivamente, dotate di elevatissime misure di biosicurezza; il seme viene parzialmente acquistato e parzialmente da verri propri (genetica Goland e Hypor). Le scrofe sono di genetica ex Seghers, ma ultimamente la rimonta era stata eseguita con scrofette scelte tra i suini da vendita per il macello (scelta dettata da esigenze economiche a causa dei costi del suinetto alla vendita estremamente bassi). Le scrofette sono tutte fecondate nella azienda da 700 capi e portate a partorire nella azienda più grande solo dopo esecuzione test PCR ed Ab PRRSV, lo svezzamento viene effettuato a 21 giorni mentre la vendita suinetti è eseguita a 60 giorni di vita, L'allevamento è Aujeszky GE negativo

VACCINAZIONI

- Scrofe
 - RA :70 e 90 gg di gestazione
 - PPV ed E. rhusiopathiae : scrofette 2 di base e richiamo a 10 gg di lattazione su tutte
 - Aujeszky: tre volte anno a tappeto
 - PRRSV tre volte anno a tappeto
- Suinetti
 - Aujeszky : alla vendita
 - MHYO + PCV2 2gg pre svezzamento

ALIMENTAZIONE:

Scrofe: Mangime autoprodotta, somministrato a bagnato una volta al giorno in gestazione in rapporto 1:3 e tre volte al giorno in lattazione in rapporto 1:2,5

Suinetti: sottoscrofa a secco ed a bagnato, primo svezzamento e formula seguente distribuiti a bagnato in rapporto 1:2,3 da subito, solo il primo giorno è disponibile un po' di secco.

SINTOMATOLOGIA:

Il problema era iniziato in giugno ma la visita aziendale viene effettuata solo ad agosto; i sintomi presentavano mortalità di 2-3 suinetti per figliata entro i primi 5 giorni di vita su figliate di numerosità medio bassa (11-12 capi nati vivi per scrofa). Viene segnalato un aumento dei baliaggi, con una prevalenza di figliate di scrofe pluripare nell'ordine del 30% dei capi in lattazione presenti; i suinetti presentavano qualche lesione cutanea sulle articolazioni della zampe anteriori e totale assenza di tosse, diarrea ed artriti ma dimagrimento, atassia e segni

di nervosismo su molti soggetti, soggetti che nelle gabbie si muovevano di continuo; qualche bava alla bocca su alcuni suinetti morti. Il peso medio allo svezzamento (21 gg) era inferiore ai 5 kg sulla maggioranza delle nidiata, che a già a 10 giorni presentavano disomogeneità: nel post svezzamento non era evidente alcuna patologia e la mortalità del settore era dell'1,9% fino alla vendita dei lattoni. Ad un esame più attento si evidenziava circa un 10\15% di scrofe in posizione sternale in sala parto, e la stessa numerosità % (non coincidente per soggetti) presentava mangime avanzato nel truogolo; le mammelle in qualche caso erano vuote ed in altri casi turgide, edematose e doloranti al tatto. Si potevano notare segni di escoriazione fino a vere e proprie ferite sulle mammelle ed i soggetti con questi sintomi erano refrattari ai trattamenti antibiotici ed antinfiammatori di qualsiasi tipo, anche reiterati; in qualche caso era presente cannibalismo, rara la stipsi.

Alla necropsia dei suinetti si evidenziavano grave cachessia con rachide in evidenza, stomaco ed intestino vuoti con aria nelle anse intestinali, edema sottocutaneo, vescica vuota, assenza di linfadenite, diarrea e polisierosite;

DIAGNOSI ANATOMOPATOLOGICA: grave disidratazione ed ipoglicemia

DIAGNOSI DIFFERENZIALI: Clostridiosi, Setticemia da E.Coli, Setticemia da Strepto suis, Setticemia da H. Parasuis. PRRS.

CAMPIONE	INDAGINI DI LABORATORIO
Intestino suinetti	E. Coli enterotossici, Rotavirus, Coronavirus, Clostridi
Sangue suinetti	PCR per PRRSV
Carcassa suinetti	Streptococco, H.Parasuis

RISULTATI

Presenza di E.Coli non emolitico, negativi tutti gli altri risultati

DIAGNOSI EZIOLOGICA: sospetto di morte per disidratazione ed ipoglicemia in seguito ad agalassia od ipogalassia della scrofa, causati da eccessivo ingrassamento dei riproduttori

MANAGEMENT, PREVENZIONE, TRATTAMENTI E FOLLOW UP: la precedente gestione alimentare erroneamente aveva previsto un ulteriore miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del mangime lattazione per produrre più latte (più proteina, più amido, più grassi) imputando la ridotta galattopoiesi ad un insufficiente apporto alimentare in sala parto. Questa scelta, lungi dal migliorare la galattopoiesi, ha esacerbato le problematiche di mortalità sottoscrofa e la scarsa attitudine degli animali all'allattamento su animali già comunque grassi alla entrata in sala parto

INTERVENTI: produzione di un mangime periparto con più fibra e sorbitolo (lassativo), alleggerimento della formula lattazione (meno strutto, meno proteine, più fibra), contemporanea ricalibratura della formula gestazione (meno amido, più fibra) e della curva alimentare in gravidanza, con inserimento di betaina e colina cloruro come disintossicanti epatici per un tempo definito. Primi flebili miglioramenti a partire da un mese circa dalla messa in atto dei nuovi piani alimentari. Notevole miglioramento dopo la immissione in sala parto di scrofe alimentate per tutta la gestazione secondo in nuovo piano alimentare (dicembre \gennaio), persistenza del problema solo in alcuni animali superiori ai 5 parti (pressochè impossibile smagrirle...)

DISCUSSIONE

Il peccato originale era nella precedente gestione alimentare, cioè pensare che, per aumentare il peso alla nascita ed allo svezzamento, fosse necessario alzare sia i nutrienti dei mangimi di gestazione che di lattazione (AA, Energia, curve), è più si insisteva nel migliorare la qualità dei mangimi più il problema dei suinetti diventava evidente; se poi i riproduttori in questione sono geneticamente «muscolari» (rimonta effettuata scegliendo le scrofette da animali destinati all'ingrasso) il peggioramento è ancora più marcato.

**CASO CLINICO: INTOSSICAZIONE DA ARSENICO
IN SUINI ALL'INGRASSO**

CASE REPORT: ARSENIC INTOXICATION IN GROWING PIGS

SCOLLO A.

Medico Veterinario, Suivet snc;

Parole chiave: Suini, arsenico, intossicazione

Key words: Swine, arsenic, intoxication

INTRODUZIONE

L'arsenico è un elemento ubiquitario che si trova nel terreno, nelle rocce, nell'atmosfera, nelle acque e negli organismi. È mobilitato da una combinazione di processi naturali come le reazioni termiche, attività biologiche ed emissioni vulcaniche così come talvolta anche dall'attività dell'uomo. Le maggiori problematiche derivano però dalla mobilitazione in condizioni naturali. Delle diverse fonti di arsenico nell'ambiente, l'acqua è certamente quella che crea i maggiori problemi sulla salute umana ed animale. In particolare, il problema si estende a macchia di leopardo a seconda delle caratteristiche geologiche locali e della disponibilità di acqua, sia essa di superficie (laghi, fiumi), sotterranea o piovana. Mentre le acque di superficie sono quelle maggiormente esposte a contaminazioni, quelle sotterranee possono raggiungere livelli anche molto alti di arsenico indipendentemente da eventi causati dall'uomo (Smedley e Kinniburgh, 2002). Le due possibili forme chimiche dell'arsenico sono quella organica e quella inorganica, la seconda caratterizzata dalla maggiore capacità di indurre tossicità rispetto alla prima. La gravità dell'intossicazione è strettamente dipendente dalla dose, dalla suscettibilità individuale all'arsenico stesso, e dall'età dell'individuo. Mentre l'esposizione cronica all'arsenico provoca danni al sistema vascolare causando ipertensione e patologie cardiovascolari, la tossicità acuta può causare cardiomiopatia ed ipotensione. Tuttavia è molto frequente anche un effetto neurologico periferico causato dall'esposizione all'arsenico per lunghi periodi, oltre ad un effetto gastroenterico dovuto alla tossicità epatica che provoca un incremento dei livelli di enzimi del fegato (Jomova et al., 2011). Nel suino sono riportati alcuni casi di intossicazione acuta, ma mancano dettagli sull'evenienza di una intossicazione cronica. Scopo del lavoro è quello di descrivere un caso intossicazione cronica da arsenico in un sito italiano di suini all'ingrasso.

Descrizione del caso

Il caso descritto è stato rilevato in un'azienda suinicola da ingrasso situata nella provincia di Brescia. L'allevamento, composto da due capannoni identici con pavimentazione a grigliato e ventilazione naturale, ospitava 2500 animali grassi. La mortalità media calcolata negli ultimi 4 cicli di ingrasso era del 2,7%. Gli animali erano alimentati a broda tramite 3 pasti giornalieri, con una diluizione farina:acqua di 1:4. Gli animali, di origine danese, erano arrivati nel sito al peso di 30 kg di media ed erano stati trattati all'accasamento con flumechina 50% (2,4 gr/q. le di peso vivo per 5 giorni). Prima dell'arrivo in Italia gli animali erano stati vaccinati per *Mycoplasma* e Circovirus, mentre in Italia erano stati sottoposti a profilassi vaccinale per la malattia di Aujeszky secondo quanto previsto dalla legislazione in vigore.

L'inizio della sintomatologia è avvenuto quando gli animali avevano raggiunto un peso medio di circa 60 kg. Circa il 2,8% degli animali aveva cominciato a mostrare una iniziale apatia, con anoressia e sporadica diarrea. Nel giro di poche ore, i sintomi peggioravano e

venivano affiancati da incoordinazione, convulsioni, successiva paralisi flaccida degli arti, e collasso (Figura 1A e 1B). La morte sopraggiungeva nella totalità degli animali clinici nel giro di circa 24-36 ore, in totale assenza di febbre. Il Grafico 1 riporta la mortalità nel corso delle settimane, che ha mostrato un incremento costante con il passare del tempo.

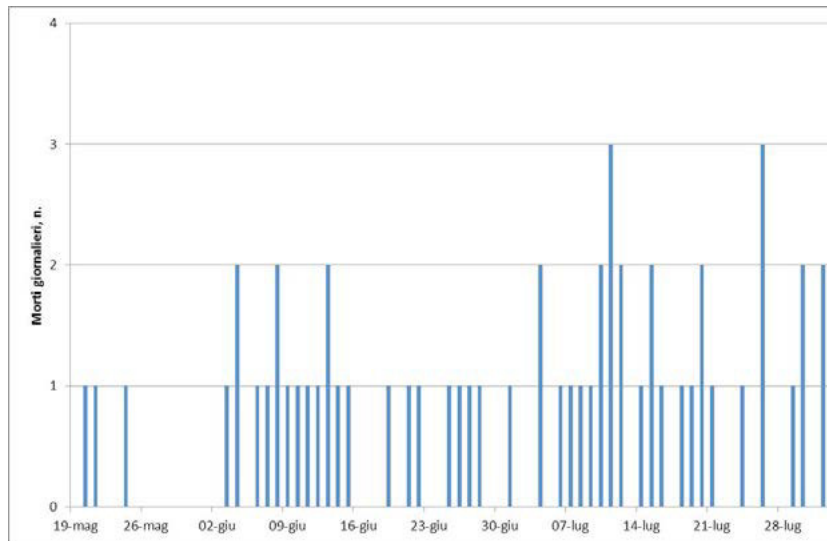


Grafico 1. Mortalità giornaliera dei suini nelle diverse settimane seguenti la prima manifestazione clinica.
Graph 1. Daily mortality of pigs in several weeks following the first clinical manifestation.



Figura 1A e 1B. Paralisi flaccida degli arti, che precedevano il collasso e la morte degli animali.
Figure 1A and 1B. Flaccid paralysis of the legs, which preceded the collapse and death of animals.

All'esame autoptico gli animali mostravano una severa gastrite ed un contenuto intestinale emorragico (Figure 2A e 2B). Nella valutazione delle diagnosi differenziali sono stati prese in esame lo *Streptococcus Suis*, la malattia degli edemi (*E. Coli*), la malattia di Aujeszky, ed una intossicazione con causa non nota. Sono stati dunque mandate delle matrici tissutali al laboratorio (tessuto nervoso, meningi, milza, fegato, linfonodi, sangue ed intestino) per indagini mirate ad individuare la corretta diagnosi. A seguito di esame batteriologico completamente negativo ed altrettanta negatività alla rt-PCR per il virus Aujeszky, il coinvolgimento da agente eziologico è stato escluso. A livello istologico (rene, occhio,

encefalo) erano però emersi focali quadri di periarterite linfoplasmacellulare nel rene, linfogranulocitosi e coagulazione intravasale, congestione della tonaca vascolare della corioide nell'occhio, e congestione, coagulazione intravasale ed emorragia localizzata ad un'area corticale nell'encefalo.

Dovendo prendere in esame l'ipotesi di intossicazione ed avendo escluso l'alimento in quanto consumato tal quale anche da altre aziende, è stata effettuata un'analisi approfondita dell'acqua. Oltre ad i più classici parametri analitici (pH, durezza, conducibilità elettrica ecc.) sono stati valutati approfonditamente anche tutti i parametri di potabilità e gli elementi inquinanti. Ne è emersa una elevatissima concentrazione di arsenico, pari a 341 µg/l e quindi più di 30 volte maggiore rispetto ai limiti di potabilità imposti dalla legislazione europea (10 µg/l). Per confermare il dato e per valutare la quota di arsenico inorganico presente nell'arsenico totale, una seconda analisi comprensiva di speciazione dell'elemento è stata effettuata nell'acqua così come in muscolo, rene e fegato degli animali deceduti. L'arsenico in forma inorganica, e dunque più pericolosa, è risultato essere la quota più rappresentativa dell'elemento (acqua: 278 µg/l; muscolo: 20 µg/kg; fegato: 18 µg/kg; rene: 31 µg/kg). A seguito delle analisi, è stata emessa diagnosi di intossicazione da arsenico.



Figure 2A e 2B. Severa gastrite e contenuto intestinale emorragico all'esame autoptico.
Figures 2A and 2B. Severe hemorrhagic gastritis and intestinal contents at autopsy.

Sebbene gli strumenti di trattamento dell'acqua e di rimozione dell'arsenico siano molteplici (Choong et al., 2007), il loro elevato costo ha orientato verso la scelta di diluire e conseguentemente disperdere l'arsenico nell'acqua utilizzata per costituire la broda tramite l'inserimento di siero vaccino. L'acqua di pozzo aziendale dunque, che prima costituiva la totalità della parte liquida della broda, è stata ridotta del 50%, con conseguente riduzione nella stessa percentuale anche dell'arsenico assunto giornalmente dai suini.

Il follow up della mortalità seguente alla diluizione dell'acqua di pozzo è indicato nel Grafico 2, nel quale è illustrata la graduale riduzione della mortalità fino a sua completa sparizione insieme alla sintomatologia clinica.

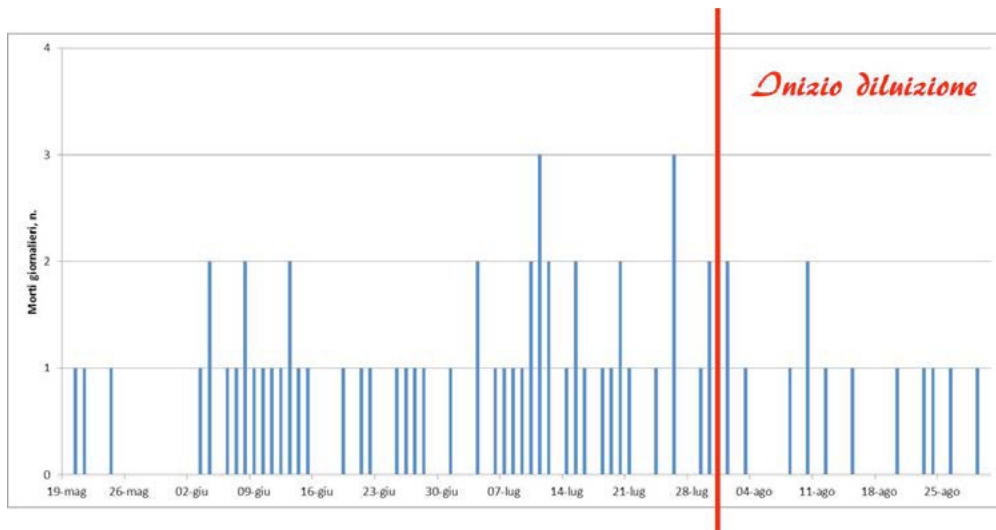


Grafico 2. Mortalità giornaliera dei suini nelle diverse settimane prima e dopo (linea rossa) la diluizione dell'acqua.

Graph 2. Daily mortality of pigs in several weeks before and after (red line) water dilution.

DISCUSSIONE

Il presente caso clinico fornisce una prima evidenza della possibile intossicazione cronica da arsenico nel suino, specie nella quale fino ad ora erano stati descritti solo casi acuti. Nell'uomo la tossicità cronica da arsenico è associata ad una sintomatologia clinica simile a quella osservata nel suino (neuropatia periferica, apatia, gastroenterite), sebbene nel primo siano frequenti anche casi di intossicazione a bassissimi dosaggi protratti negli anni che portano a tumori ed alterazioni cutanee (Jomova et al., 2011). A causa delle evidenze cliniche di tossicità cronica da arsenico, i livelli massimi che questo elemento può aggiungere nell'acqua potabile sono stati stabiliti a livello europeo a 10 µg/l.

La diluizione adottata del presente caso clinico ha portato alla riduzione della quantità giornaliera di arsenico inorganico assunta da 2669 µg a 1334 µg. Sebbene anche il dosaggio raggiunto continui ad essere elevatissimo per l'uomo in quanto di gran lunga superiore alla soglia di tossicità acuta (200 µg/l), il suino è una specie molto resistente a questo elemento. In bibliografia è infatti riportata una soglia di tossicità acuta per il suino di 100.000 µg/kg di peso vivo, diagnosi confermabile con il ritrovamento di livelli di arsenico nel rene e nel fegato maggiori di 10.000 µg/kg (10 ppm) (Ensley e Osweiler, 2012). Tuttavia, è probabile che i livelli contenuti nell'acqua di pozzo dell'azienda coinvolta nel presente caso clinico non fossero sufficienti per scatenare una sintomatologia acuta ma in grado di accumularsi nel suino durante le prime settimane di accasamento (durante l'accrescimento dai 30 ai 60 kg), determinando una sintomatologia tardiva ma persistente fino ad eliminazione della causa.

Si può quindi concludere che livelli di arsenico inorganico nell'acqua maggiori di 300 µg/l possono provocare un'intossicazione cronica nel suino, sottolineando come la qualità dell'acqua sia un aspetto molto spesso sottovalutato nelle indagini di campo, ma che può rappresentare notevoli criticità in allevamento.

BIBLIOGRAFIA

- Choong, T. S., Chuah, T. G., Robiah, Y., Koay, F. G., & Azni, I. (2007). Arsenic toxicity, health hazards and removal techniques from water: an overview. *Desalination*, 217(1-3), 139-166.
- Ensley, S.M., & Osweiler, G.D. (2012). Toxic minerals, chemicals, plants, and gases. In: *Diseases of swine*, tenth Ed. Edited by Zimmerman, J.Z., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. John Wiley & Sons, Inc., 953-967.
- Jomova, K., Jenisova, Z., Feszterova, M., Baros, S., Liska, J., Hudcova, D., ... & Valko, M. (2011). Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease. *Journal of Applied Toxicology*, 31(2), 95-107.
- Smedley, P. L., & Kinniburgh, D. G. (2002). A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied geochemistry*, 17(5), 517-568.

ATTI DEL XLIII MEETING ANNUALE

**PIÙ PRODUTTIVITÀ E MENO ANTIBIOTICI?
YES, WE CAN!**

PARTE I

Reggio Emilia, 16-17 Marzo 2017

STRATEGIE ALIMENTARI PER CONTENERE L'USO DI ANTIBIOTICI NEL SUINO

PAOLO TREVISI

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) – Università di Bologna
Viale G. Fanin, 44 - 40127 Bologna – Italia*

La riduzione dell'impiego di antibiotici in medicina umana e veterinaria rappresenta la strategia di intervento principale con cui l'Unione Europea mira a ridurre l'insorgenza di nuova antibioticoresistenza. Per quanto riguarda la zootecnia, la Commissione Europea ha recentemente pubblicato il documento 2015/C299/04 in cui sono delineate specifiche linee guida volte a ridurre l'impiego di antibiotici nelle principali filiere produttive. In esso, viene sottolineato come l'approccio basato sul "buon uso" dell'antibiotico, necessita di essere affiancato ad interventi preventivi basati su strategie di gestione della mandria che tengano sempre più in considerazione aspetti quali benessere, biosicurezza e fabbisogni alimentari, quali fattori chiave per garantire un adeguato stato di salute degli animali, promuovendone lo sviluppo delle difese immunitarie naturali così da favorire la resistenza alle infezioni.

Tra i diversi comparti zootecnici, quello suinicolo è tra primi per consumo di farmaci ad azione antimicrobica, mentre tra le fasi produttive, il periodo parto-svezzamento rappresenta il periodo con maggiore incidenza di impiego di tali sostanze, in particolar modo per trattare la diarrea in post-svezzamento (PWD). Alla luce di queste evidenze, particolare attenzione deve essere posta all'omeostasi del tratto gastro-intestinale ed al controllo delle infezioni ad esso correlate, specialmente nei giovani animali. In questo complicato quadro, sono sempre maggiori i dati che evidenziano l'azione del microbiota intestinale quale fattore determinante per stimolare la maturazione del tratto gastro intestinale (GIT) e prevenirne la colonizzazione da parte di batteri patogeni. Nonostante siano numerosi gli studi volti a comprendere i fattori che influenzano il profilo microbico intestinale del suino, ad oggi non vi è un consenso unanime sulla definizione di "microbiota bilanciato o favorevole". In parte ciò è dovuto alle numerose scoperte favorite dalle scienze "omiche" che hanno portato ad un maggiore comprensione dei fattori che modificano il metabolismo batterico, oltre che ad evidenziare la stretta interazione ospite-microbiota-ambiente. Queste informazioni hanno restituito un quadro molto complesso che ha contribuito a definire il concetto di "continuità" in cui si evidenzia come scrofa, suinetto e suino in accrescimento sono collegati, dimostrando la necessità di spostare l'attenzione sul periodo di gestazione/allattamento, quali momenti determinanti per condizionare l'intera vita del suino. Nonostante gli enormi progressi effettuati, resta ancora molto da spiegare in merito alla variabilità della risposta fisiologica che si osserva negli animali in conseguenza a stimoli ambientali specifici (igiene, dieta, ecc.). Questa osservazione ha portato gli scienziati a considerare la possibilità di integrare l'approccio genetico ed il management degli animai al fine di incidere in modo significativo sulla salute e l'efficienza produttiva degli animali. Nonostante l'attivazione del sistema immunitario in risposta ad un'infezione è una condizione ormai nota da tempo, la scoperta dei Toll Like Receptors (TLRs) ha evidenziato come ci sia un dialogo continuo tra l'ospite e il microbiota presente nel lume intestinale (Luke *et al.* 2013) e come tale dialogo consenta di mantenere "pronto" il sistema immunitario nel caso dovessero verificarsi infezioni. Inoltre, sono sempre più numerose le associazioni tra mutazioni presenti nella sequenza genica di alcuni geni e la capacità dall'ospite ad esprimere una risposta immunitaria, dimostrando l'importanza della variabilità individuale nell'interazione tra ospite e microbiota e di conseguenza nell'intensità di attivazione del sistema immunitario.

Oltre agli aspetti genetici, la produzione qualitativa e quantitativa di proteine legate alla risposta immunitaria è strettamente connessa con i fabbisogni nutritivi dell'ospite. Infatti questi possono cambiare in funzione delle condizioni fisiologiche e di allevamento (igiene, stress, ecc.) dell'animale. Melchior *et al.* (2003) hanno osservato che il catabolismo del Triptofano aumenta nei suini sottoposti ad infiammazione polmonare cronica evidenziando come gli aminoacidi, giocano un ruolo fondamentale nell'omeostasi fisiologica degli animali. Per supportare questa tesi, sono state condotte una serie di prove finalizzate allo studio dei fabbisogni in triptofano e treonina in suini geneticamente e fenotipicamente suscettibili ad *Escherichia coli* F4 (ETEC). I risultati hanno evidenziato una maggiore necessità di questi aminoacidi durante l'infezione, mentre i fabbisogni in soggetti non suscettibili erano decisamente inferiori (Trevisi *et al.*, 2009; 2015). Inoltre, la sola predisposizione all'infezione, è risultata essere in grado di modificare i fabbisogni in triptofano, suggerendo una possibile stimolazione del sistema immunitario in questi suini anche in assenza di una infezione specifica (Trevisi *et al.*, 2010).

In conclusione è evidente come, un approccio integrato, è l'unica via per ridurre in modo significativo l'impiego di antimicrobici nel settore suinicolo, così come negli altri comparti produttivi zootecnici, migliorando sia l'uso del farmaco, sia comprendendo meglio l'interazione tra fattori ambientali e genetici condizione necessaria per definire strategie di intervento sempre più mirate.

BIBLIOGRAFIA

- Bovo S., G. Mazzoni, G. Galimberti, D. G. Calò, F. Fanelli, M. Mezzullo, G. Schiavo, A. Manisi, P. Trevisi, P. Bosi, S. Dall'Olio, U. Pagotto and L. Fontanesi. 2016. Metabolomics evidences plasma and serum biomarkers differentiating two heavy pig breeds. *Animal*, *in press* doi:10.1017/S1751731116000483.
- O'Neill L.A. J., D. Golenbock & Andrew G. 2013. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. 13: 453–460
- Melchior D., N. Le Floch, Sève B. 2003. Effects of chronic lung inflammation on tryptophan metabolism in piglets. *Adv Exp Med Biol*. 527: 359-62.
- Trevisi P., E. Corrent, M. Mazzoni, S. Messori, D. Priori, Y. Gherpelli, A. Simongiovanni, P. Bosi. 2015. Effect of added dietary threonine on growth performance, health, immunity and gastrointestinal function of weaning pigs with differing genetic susceptibility to *Escherichia coli* infection and challenged with *E. coli* K88ac. *J Anim Physiol Anim Nutr*. 99(3): 511-20.
- Trevisi P., E. Corrent, S. Messori, L. Casini, P. Bosi. 2010. Healthy newly weaned pigs require more tryptophan to maximize feed intake if they are susceptible to *Escherichia coli* K88? *Livest Sci*. 134: 236–238.
- Trevisi P., D. Melchior, M. Mazzoni, L. Casini, S. De Filippi, L. Minieri, G.A. 2009. Tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weanling pigs orally challenged with *Escherichia coli* K88. *J. Anim. Sci*. 87: 148-156.

INFLUENZA DELLE DIFFERENTI PATOLOGIE SULL'INDICE DI CONSUMO DEGLI ANTIBIOTICI. RIDUZIONE DELL'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI ATTRAVERSO LA VACCINAZIONE

VIDAL HERAS A.

Vall Company Group

INTRODUZIONE

L'utilizzo di antibiotici in generale, e più in particolare nella produzione animale, è un tema attuale di dibattito e preoccupazione sociale. La comparsa di batteri resistenti e super-resistenti, ha portato a maggior controllo e attenzione da parte del sistema sanitario e, di conseguenza, impone delle variazioni sulle procedure e sulle valutazioni in campo veterinario riguardo l'utilizzo degli antibiotici.

A questo, si aggiunge anche la richiesta ormai generalizzata di carne *antibiotic-free* da parte dei consumatori. Questo perché la scarsa informazione a riguardo non rende evidente al consumatore che la carne che arriva al mercato è già priva di antibiotici, come da normative vigenti. Inoltre, il prossimo futuro vede un'evoluzione della domanda verso carne NAE (*not antibiotic ever*), cioè ottenuta da animali mai trattati con antibiotici.

Come veterinari dovremmo difendere l'uso responsabile degli antibiotici, per la salute globale (umana e animale) e per il benessere degli animali, e d'altra parte, dovremmo rendere i consumatori più consapevoli della situazione reale. L'uso degli antibiotici deve essere valutato in modo critico, evitando gli abusi fatti nel passato e cercando nuove soluzioni per affrontare meglio i differenti problemi. In questo contesto, i costi non potranno essere l'unica ragione che guida le decisioni in tema di sanità di allevamento e produzioni animali.

Misura dell'utilizzo di antibiotici

Attualmente vengono utilizzati in Europa diversi metodi per misurare il consumo di antibiotici. Non ci sono metodi giusti o sbagliati per farlo, ma la valutazione dei risultati ottenuti da ciascun metodo deve essere mirata e confrontabile. Nella nostra azienda viene utilizzato un indice, dove i mg di principio attivo sono corretti con la dose giornaliera. Altri sistemi considerano i mg senza considerare la dose (10 mg/kg, 20 mg/kg) e altri prendono in considerazione il trattamento, compresa la durata prevista. Nonostante in Europa non vi sia un'armonizzazione dei diversi indici/metodi, è invece importante applicare coerentemente lo stesso metodo per misurare il consumo di antibiotici all'interno dei propri sistemi, in modo da ottenere risultati confrontabili e migliorabili. Sebbene la stima $\text{€speso} / \text{maiale}$ sia correlata positivamente con l'uso di antibiotici ($R^2 = 0,54$), non può essere l'unico modo per monitorarne il consumo. A parità di costo del farmaco, la variazione dell'indice di consumo è notevole.

Uso di antibiotici in relazione alle differenti patologie

Nella nostra società il veterinario responsabile classifica i suini trattati sulla base della malattia principale diagnosticata durante il periodo di ingrasso. La diagnosi si basa su sintomatologia, risultati dell'esame necroscopico e delle analisi di laboratorio. Le informazioni riportate nella tabella 1 sono il risultato dell'analisi dell'uso di antibiotici rispetto alla malattia diagnosticata. In generale, è stata rilevata una notevole variazione all'interno della stessa patologia, dato che l'incidenza di una malattia non è solo associata al patogeno, ma è influenzata anche da ambiente, gestione, alimentazione ecc.

Patologia	Indice di utilizzo degli antibiotici
Dissenteria suina	27,6
App	21,75
Circovirus	20,39
Polmonite enzootica	20,3
Diarree virali	19,2
Malattia di Glasser	18,9
Influenza	19,1
Ileite	15,4
PRRS	19,2
Non diagnosticata	14,2

Tabella 1. Indice di utilizzo degli antibiotici in relazione alle patologie diagnosticate.

Le malattie con un indice più elevato di consumo di antibiotici sono risultate dissenteria suina, App e polmonite enzootica. In tutte le malattie si è osservata un'ampia variazione tra i diversi focolai. Ma variazione significa opportunità, dato che pur non conoscendo ancora esattamente le ragioni che stanno alla base di tale variazione, crediamo che il microrganismo, l'ambiente, la gestione e la scelta di prescrivere l'antibiotico in particolare possano svolgere un ruolo fondamentale.

Vaccini e indice di consumo di antibiotici

Nei suini vaccinati per App con il vaccino commerciale, è stata evidenziata una riduzione del 20% dell'uso di antibiotici. Per quanto riguarda la dissenteria suina, la vaccinazione dell'intera popolazione di scrofe è stata in grado di evitare la comparsa di sintomatologia e ostacolare la trasmissione verticale dei batteri. Nessuna delle nidiata di quell'allevamento ha sviluppato alcun sintomo clinico. Le vaccinazioni per *Mycoplasma* e influenza non hanno invece portato ad alcuna diminuzione dell'indice di utilizzo degli antibiotici.

DISCUSSIONE

L'utilizzo di vaccini potrà diventare uno degli strumenti di elezione per ridurre l'uso di antibiotici, pur non essendo una soluzione semplice da applicare. Le vaccinazioni dovranno essere associate a una buona comprensione delle dinamiche d'infezione, senza dimenticare altri punti chiave quali l'applicazione di approcci globali e di adeguate strategie sanitarie a livello di allevamento, le corrette pratiche di movimentazione dei suinetti, il tutto pieno-tutto vuoto e la produzione per lotti. D'altro canto deve poi essere migliorata la fase di prescrizione dell'antibiotico da parte del veterinario aziendale. Gli animali senza alcuna diagnosi hanno un indice di 14,2 giorni di trattamento. Questi giorni di trattamento sono la metà di quelli normalmente utilizzati in un focolaio di dissenteria suina, ma rimangono comunque troppi. Fino ad oggi si è utilizzato il trattamento antibiotico più a scopo profilattico che terapeutico, ma nel prossimo futuro dovranno essere maggiormente considerati i rischi e, di conseguenza dovranno essere cambiati i criteri di scelta associati all'utilizzo di antibiotici.

ATTI DEL XLIII MEETING ANNUALE

PIÙ PRODUTTIVITÀ E MENO ANTIBIOTICI? YES, WE CAN!

PARTE II

Reggio Emilia, 16-17 Marzo 2017

ANTIBIOTICORESISTENZA IN MEDICINA UMANA: DIMENSIONI DEL PROBLEMA E STRATEGIE DI INTERVENTO

CASTELLI F., MANGIONI D.

Clinica di Malattie Infettive e Tropicali, Università di Brescia

Dalla scoperta del primo farmaco antibiotico, la penicillina, da parte di Alexander Fleming nel 1928 è iniziata una nuova era nella medicina, l'era antibiotica. Queste molecole, che hanno goduto di un forte sviluppo nell'arco dei decenni successivi, hanno cambiato radicalmente la qualità delle cure mediche ed abbassato in modo drastico la mortalità correlata ad infezioni. L'uso massiccio e l'abuso di questi farmaci si è tuttavia accompagnato allo sviluppo e alla disseminazione di patogeni antibioticoresistenti. Oggi, a distanza di quasi 90 anni dalla scoperta di Fleming, si palesa il rischio di un'epoca post-antibiotica. Per scongiurare tale scenario sono state individuate diverse strategie di intervento: investimenti in ricerca e sviluppo di nuovi farmaci, programmi e campagne di sensibilizzazione ad un utilizzo consapevole, ed un approccio olistico, trasversale tra i diversi ambiti della Medicina, al problema secondo la visione *One Health*.

L'Italia si caratterizza per un consumo elevato di antibiotici, sia a livello ospedaliero che comunitario. Pur presentando importanti variabilità regionali, da diversi anni il nostro Paese si colloca nei report di sorveglianza europei ai livelli più alti del consumo di farmaci antimicrobici. I tassi di antibioticoresistenza, conseguenza diretta del cattivo uso degli antibiotici e dell'assenza di politiche di controllo adeguate, dimostrano dati di prevalenza allarmanti in Italia, con percentuali di patogeni resistenti quali MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a Meticillina) ed *Enterobacteriaceae* produttori di ESBL (betalattamasi a spettro esteso) o carbapenemasi tra le più alte d'Europa. Tutto questo ha un impatto clinico notevole: è dimostrato che pazienti con infezione da batteri multiresistenti hanno tassi più alti di fallimento al trattamento empirico, limitate opzioni terapeutiche, ed un maggior rischio di effetti collaterali secondari agli antibiotici disponibili. L'infezione da patogeni antibioticoresistenti aumenta in ultima analisi la mortalità dei nostri pazienti.

Sono state individuate diverse strategie per affrontare il problema dell'utilizzo scorretto degli antibiotici e della resistenza antimicrobica. Esse vanno ad agire a diversi livelli, coinvolgendo non solo il personale sanitario, ma anche l'opinione pubblica tramite campagne di formazione e sensibilizzazione al buon utilizzo dei farmaci. In ambito ospedaliero rivestono una grande importanza i programmi di *antimicrobial stewardship*, sistemi di sorveglianza e di intervento per l'utilizzo ottimale della terapia antibiotica, che, attraverso una riduzione delle resistenze ai farmaci, degli effetti collaterali e dei costi correlati all'antibioticoresistenza, hanno come obiettivo principale il miglioramento dell'outcome clinico di pazienti. Altrettanto fondamentali sono i progetti in ricerca e sviluppo di nuovi farmaci antibiotici, ma anche di vaccini e di strumenti per migliorare l'accuratezza e la rapidità diagnostica. Ultimo aspetto, certo non per importanza, è l'utilizzo di un approccio olistico al problema dell'antibioticoresistenza, capace di coinvolgere non solo la salute umana ma anche quella veterinaria e ambientale. Questa visione di *One Health Medicine* potrà infatti affrontare globalmente il problema, mirando ad ottenere un livello di salute ottimale non solo per gli uomini, ma anche per gli animali e il nostro ambiente.

LA SALUTE ANIMALE È LA BASE PER RIDURRE L'USO DEGLI ANTIBIOTICI E COMBATTERE L'ANTIBIOTICORESISTENZA: LA PROSPETTIVA EUROPEA

RICCIA.

*Dipartimento per la Sicurezza Alimentare
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Viale dell'Università, 10, 35020 Legnaro (PD)*

Il tema dell'antibioticoresistenza è estremamente vasto e variegato, e coinvolge diversi settori e professionalità nell'ambito della sanità pubblica veterinaria.

In generale, l'attività di monitoraggio e sorveglianza dell'antibioticoresistenza persegue i seguenti obiettivi principali:

- identificare l'emergenza di cloni antibioticoresistenti, e comprenderne i meccanismi di disseminazione;
- fornire dati utili per la valutazione del rischio;
- pianificare gli interventi e misurarne l'efficacia.

A livello europeo EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Center for Disease prevention and Control) ed EMA (European Medicines Agency) stanno svolgendo congiuntamente alcuni progetti, di seguito brevemente descritti.

Analysis of antimicrobial use and resistance (JIACRA)

Ha l'obiettivo di analizzare la relazione fra il consumo di antibiotici e la frequenza di resistenze nell'uomo e nelle popolazioni animali a livello europeo. Il primo report è stato pubblicato nel 2015 (il prossimo sarà pubblicato a giugno 2017). Dal report emerge come il consumo di antibiotici sia, nella media europea, più elevato nelle popolazioni animali che nell'uomo, con differenze nei singoli paesi: in 15 paesi su 26 il consumo in zootecnia è inferiore rispetto a quello per uso umano, in 3 paesi i livelli non presentano differenze significative, in 8 paesi il consumo è più elevato negli animali. L'Italia è fra i Paesi con il consumo più elevato (in termini di mg per kg di biomassa) sia negli animali che nell'uomo, ed il consumo negli animali è doppio rispetto a quello per uso umano. Per quanto riguarda le associazioni fra consumo negli animali e resistenza nell'uomo, il Report conclude che tale associazione è positiva per la resistenza ai macrolidi in *Campylobacter* e quella alla tetraciclina in *Salmonella* e *Campylobacter*, mentre per le cefalosporine non è stata evidenziata alcuna associazione. Per i fluorochinoloni, l'associazione è positiva per *E.coli*, ma non per *Salmonella* e *Campylobacter*.

Joint EFSA-EMA opinion on the reduction of the need to use antimicrobials in animal husbandry (RONAFA)

E' stata recentemente pubblicato il documento "EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)".

Questa Opinione scientifica è frutto di un lavoro di molti mesi che ha impegnato esperti sia nel settore dell'antibioticoresistenza (European Food Safety Authority) che in quello dell'uso del farmaco (European Medicines Agency) in ambito veterinario, e rappresenta un tassello fondamentale nell'approccio "one health" al problema dell'antibioticoresistenza a livello europeo. La Commissione Europea ha infatti chiesto alle due agenzie di prendere in esame le misure che possono ridurre la necessità di utilizzare gli antibiotici negli allevamenti, di quantificarne l'impatto sulla sicurezza alimentare e di proporre possibili alternative. Le

conclusioni di questo lavoro sottolineano come il problema debba essere affrontato a 360°, mettendo al centro la salute ed il benessere degli animali come condizione imprescindibile perché la riduzione significativa dell'uso dei farmaci veterinari diventi una strada percorribile e porti conseguenze positive per la salute pubblica. Sono state prese in rassegna diverse opzioni, per le quali gli esperti hanno identificato vantaggi e svantaggi che potrebbero conseguire alla loro applicazione: uso di sistemi armonizzati per il monitoraggio dell'uso degli antibiotici e dello sviluppo dell'antibioticoresistenza; definizione di target nazionali per la riduzione dell'uso degli antibiotici; implementazione di piani sanitari aziendali; maggiore responsabilizzazione dei veterinari nella prescrizione degli antibiotici; formazione, educazione e sensibilizzazione dei consumatori; maggiore disponibilità di strumenti diagnostici rapidi ed affidabili; miglioramento della gestione degli allevamenti e delle misure per la prevenzione e controllo delle malattie; necessità di ripensare i sistemi produttivi attuali per ridurre il rischio di malattia. L'Opinione scientifica riporta come vi sia un numero limitato di studi scientifici che evidenzino come l'utilizzo di misure alternative rispetto all'uso degli antibiotici influenzi positivamente i parametri sanitari. Le possibili alternative includono i probiotici e prebiotici, l'esclusione competitiva, i batteriofagi, gli immunomodulatori, gli acidi organici e i sigillanti mammari. E' auspicabile una revisione dell'impianto normativo, al fine di permettere l'utilizzo di specifici prodotti alternativi. Infine, gli esperti raccomandano lo sviluppo della ricerca al fine di valutare l'efficacia di sistemi di allevamento alternativi nella riduzione dell'antibioticoresistenza.

Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health (Antimicrobial Advice ad hoc Expert Group - AMEG)

Questo documento è stato pubblicato nel 2016, e definisce per la prima volta un livello target di utilizzo di un antibiotico (in questo caso la colistina), concludendo che:

- le vendite di colistina per uso zootecnico dovrebbero essere ridotte al minimo;
- per gli attuali "high and moderate consumers" i livelli critici e quelli ottimali vengono definiti rispettivamente pari a 5 mg/PCU e ≤1 mg/PCU;
- la riduzione nell'uso della colistina dev'essere ottenuta senza aumentare l'utilizzo di fluorochinoloni, di cefalosporine di terza e quarta generazione o il consumo generale di antibiotici;
- i target sopra menzionati devono essere raggiunti in un periodo di 3-4 anni.

European Union Summary Report on AMR

Viene pubblicato annualmente, e riguarda i casi umani nell'ambito di focolai di tossinfezione alimentare da *Salmonella* e *Campylobacter*, nonché gli isolati di *Salmonella* e *Campylobacter*, *E.coli* indicatori, *Enterococcus faecium* e *fecalis* e *S. aureus* meticillino resistenti nelle popolazioni zootecniche. Ogni anno viene identificato un "focus" per l'analisi statistica più dettagliata: pollame per i dati 2014, suini e vitelli per i dati 2015. Dagli ultimi dati pubblicati (2014) emerge come problematica la resistenza ai fluorochinoloni, mentre i livelli di resistenza ad altri CIA (critically important antimicrobials), quali le cefalosporine di terza e quarta generazione ed i carbapenemi, non destano al momento, nelle popolazioni avicole, particolari preoccupazioni. Recentemente invece sono stati evidenziati ceppi di *Salmonella* con resistenza trasferibile alla colistina: si tratta di un fenomeno da monitorare con attenzione a causa del possibile grave impatto sulla salute pubblica.

Joint ECDC-EFSA-EMA opinion on outcome indicators on surveillance of AMR and use of antimicrobials

E' un'attività appena iniziata, la pubblicazione dell'Opinione è prevista per settembre 2017.

Il mandato riguarda la definizione di indicatori per il monitoraggio e per rilevare riduzioni significative nel livello di microrganismi resistenti a farmaci d'elezione nell'uomo, negli animali, negli alimenti e nel consumo di farmaci in medicina umana ed in zootecnia. Questi indicatori, che dovranno essere in numero limitato, serviranno a monitorare l'andamento dei programmi di riduzione dei fenomeni di resistenza e del consumo dei farmaci.

BIBLIOGRAFIA

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) and EMA (European Medicines Agency). ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. Stockholm/Parma/London: ECDC/EFSA/EMA, 2015. EFSA Journal 2015;13(1):4006, 114 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4006

EMA (European Medicines Agency) Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health EMA/CVMP/CHMP/231573/2016

EMA (European Medicines Agency) and EFSA (European Food Safety Authority), 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA). [EMA/CVMP/570771/2015]. EFSA Journal 2017;15(1):4666, 245 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.4666

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2016. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. EFSA Journal 2016;14(2):4380, 207 pp. doi:10.2903/j.efsa.2016.4380

WHO (2016) Critically important antimicrobials for human medicine – 4th rev., Printed by the WHO Document Production Services, Geneva, Switzerland, ISBN 978 92 4 151146 9

EPIDEMIOLOGIA INTERSPECIFICA DELLE ANTIBIOTICO-RESISTENZE IN SUINICOLTURA: MRSA E SANITÀ PUBBLICA

SALA V.

Dipartimento di Medicina Veterinaria – Università degli Studi di Milano

Selezione delle antibiotico resistenze e MRSA

Nel corso degli anni, le batteriosi opportunistiche hanno progressivamente acquisito una rilevanza spesso inattesa nell'uomo e negli animali domestici; così, agenti già conosciuti hanno modificato le loro caratteristiche epidemiologiche, definendo riemergenze evolutive di patologie già note, mentre situazioni predisponenti e condizionanti hanno determinato nuove malattie da microrganismi in precedenza apatogeni.

Le motivazioni di questi eventi sono state, di volta in volta, riferibili alle nuove modalità di allevamento degli animali, alle variazioni ambientali legate conseguenti all'attività dell'uomo, ma anche ai cambiamenti nelle abitudini alimentari e agli scambi commerciali di animali e loro prodotti; quando è stato coinvolto l'uomo, effetti non trascurabili sono stati provocati anche da fenomeni sociali, come l'inurbamento o l'inquinamento, dalle nuove sindromi immunodepressive e dagli errori terapeutici che, sia nell'ambito veterinario, sia in quello della medicina umana, hanno selezionato varianti batteriche ad elevata resistenza nei confronti degli antibiotici più frequentemente utilizzati per gli interventi clinici routinari.

È questo il caso delle varianti della specie *Staphylococcus aureus* divenute progressivamente multi - resistenti agli antibiotici, e che perciò sono state catalogate con l'acronimo MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* o Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus*); la definizione può essere estesa a tutti i ceppi di *S. aureus* che hanno sviluppato resistenza agli antibiotici beta-lattamici che comprendono, oltre alle penicilline naturali o semi-sintetiche, anche meticillina, dicloxacillina, nafcillina, oxacillina e le cefalosporine.

S. aureus è comunemente presente nelle narici e, meno frequentemente, sulle altre mucose delle prime vie respiratorie; di conseguenza, anche gli MRSA mantengono lo stesso tropismo e gli individui sani possono localizzarli in modo asintomatico per tempi variabili da poche settimane a diversi anni.

Gli stafilococchi meticillino-resistenti sono storicamente coinvolti nelle infezioni ospedaliere e, negli ultimi anni anche in quelle degli ambiti delle comunità sociali e assistenziali; oggi, questi stafilococchi rappresentano una delle principali cause d'infezioni della pelle e dei tessuti molli dell'uomo e, in alcuni casi, possono determinare anche patologie gravi a prognosi infausta, come la fascite necrotizzante o la polmonite.

La colonizzazione asintomatica, caratteristica di questi batteri, unita alla pressione selettiva legata all'uso talvolta irrazionale di antibiotici nei mangimi, danno origine a situazioni epidemiologiche tali da favorire l'amplificazione del contagio e la trasmissione clinicamente silente; non è nemmeno da trascurare la possibile diffusione di MRSA nella catena alimentare e agli animali domestici.

Inevitabilmente, vista la diffusione e la pericolosità delle patologie correlate, ci si è interrogati riguardo al ruolo epidemiologico delle specie animali da cui originano le antibiotico-resistenze trasferibili all'uomo; è chiaro il riferimento alle tecnologie zootecniche intensive, nelle quali le medicazioni strategiche, scorrettamente impiegate, possono rappresentare un serio problema in questa prospettiva.

Anche l'European Food Safety Authority (EFSA), attraverso il suo Biohazard Panel, ha

valutato i fattori di insorgenza e amplificazione delle infezioni da MRSA nella produzione suinicola dell'Unione Europea; considerando le peculiarità epidemiologiche del sistema di allevamento nella propagazione delle infezioni e nell'insorgenza delle antibiotico-resistenze, è infatti logico considerare il suino una potenziale fonte d'infezione per l'uomo.

La situazione europea

In particolare, negli allevamenti intensivi di animali destinati alla produzione alimentare, è stato ripetutamente segnalato un clone di MRSA, identificato con la sigla ST-398 e in grado di determinare localizzazioni asintomatiche; in Europa, la sua frequenza è molto variabile, ma sono stati descritti casi d'infezione nelle categorie professionalmente esposte al contatto con gli animali, come allevatori e veterinari. Questa variante è diffusa tra gli allevatori in Olanda, con una prevalenza aziendale compresa tra 23 e 81%, ma altre segnalazioni provengono da Belgio, Danimarca, Germania e Francia.

Studi caso-controllo hanno inoltre indicato il trasferimento dell'infezione dagli allevatori di suini ad altri individui, principalmente conviventi; su queste basi è stata riconosciuta la potenzialità zoonotica di MRSA.

Alcuni studi osservazionali hanno dimostrato la variabilità della virulenza e della trasmissibilità di ST398, isolata dagli animali e dall'uomo negli allevamenti, sia da riproduzione, sia destinati alla produzione di suini da macello. Perciò, considerando il numero elevato di individui potenzialmente portatori nella zootecnia intensiva, la sua diffusione dovrebbe essere limitata, a tutela della salute pubblica.

La situazione italiana

Considerando quanto già dimostrato riguardo alla capacità di *Staphylococcus aureus* di selezionare la meticillina-resistenza in ambito suinicolo e di stabilire, di conseguenza, veri e propri cicli epidemiologici interspecifici, il nostro gruppo di lavoro si è proposto, in questi ultimi anni, di indagare il rischio occupazionale, in particolare per ciò che riguarda l'esposizione professionale dei medici veterinari operanti nel settore.

Le indagini sono state condotte in collaborazione con il Laboratorio di Microbiologia, Virologia e Diagnostica delle Bioemergenze del Dipartimento di Scienze Biomediche e Cliniche "L. Sacco" dell'Università di Milano, da qualche tempo impegnato nella connotazione epidemiologica delle infezioni da MRSA in altre categorie umane a rischio, in ambito ospedaliero e socio-sanitario.

È stata così segnalata, in occasione del Meeting SIPAS 2014, la presenza di pattern genomici sovrapponibili nei maiali da macello, nelle scrofe e in quattro medici veterinari; questi ultimi, portatori di MRSA a livello nasale, erano in tre casi responsabili diretti del management di grossi insediamenti suinicoli intensivi della pianura padana (localizzati a Brescia, Mantova e Modena) mentre il quarto era impiegato a tempo pieno in un macello industriale di suini.

I risultati del lavoro, in seguito divulgati anche in ambito internazionale, hanno inoltre dimostrato la scarsità delle localizzazioni negli operatori della macellazione, circoscrivendo di fatto il rischio infettivo al contatto con i suini in vita; la conferma incontrovertibile di questa indicazione è derivata dalla maggiore numerosità degli isolamenti di MRSA provenienti dai tamponi nasali delle scrofe, rispetto a quella ottenuta dai suini in sede di macellazione.

Durante lo stesso Meeting annuale della Società, 117 partecipanti, comprendenti Veterinari Aziendali, operanti nelle Aziende Sanitarie Locali e negli Istituti Zooprofilattici Sperimentali, professionisti operanti per conto di Companies commerciali del settore suinicolo e tecnici aziendali, si sono volontariamente sottoposti al campionamento mediante tampone nasale per estendere i rilievi già eseguiti in precedenza.

I risultati dell'indagine, ancora condotta in collaborazione con l'Ospedale Luigi Sacco di Milano, sono stati presentati durante il Meeting SIPAS 2015 e hanno evidenziato una

presenza di MRSA maggiore rispetto all'indagine precedente, con una percentuale di soggetti positivi passata dal 25% a un ben più rilevante 41,9%; è stato così confermato come MRSA sia diffusamente presente negli operatori a vario titolo impiegati in suinicoltura, indipendentemente dall'età e dagli anni di occupazione nel settore. I dati anamnestici rilevati al momento del prelievo hanno permesso di dimostrare la corrispondenza tra il tempo effettivamente speso a stretto contatto con i suini e, ancora una volta, i veterinari aziendali hanno costituito il nucleo centrale delle positività.

È stata di nuovo dimostrata la sovrapponibilità dei disegni genomici degli isolamenti da uomo con quelli da suino, confermando l'ipotesi epidemiologica, già in precedenza elaborata, della interspecificità dei cloni di MRSA; questa caratteristica svolge un importante effetto di potenziamento della diffusione e della capacità patogena di qualsiasi patogeno e MRSA ne rappresenta la conferma sperimentale.

Gli sviluppi più recenti del nostro gruppo di ricerca, in fase di pubblicazione, hanno riguardato lo spa-Typing di un gruppo di MRSA isolati da suini e medici veterinari nel corso delle indagini precedenti; dai risultati ottenuti, è stata confermata la netta prevalenza dello spa-tipo ST-398 nei veterinari e nei suini. Al di là del dato, comunque importante in termini di numerosità del campione e degli isolamenti, questa indicazione equipara, in termini di epidemiologia interspecifica di questa infezione, il nostro sistema suinicolo a quelli nord-europei.

CONCLUSIONI

Quanto finora ottenuto, conferma appieno l'esistenza di un percorso epidemiologico delle antibiotico-resistenze, lungo il quale la selezione avviene in ambito animale e l'esposizione professionale dell'uomo legata specificatamente a fattori di rischio non solo ambientali, può rappresentare la via d'accesso alla circolazione interumana.

Questa indicazione corrisponde a quella fornita dal Biohazard Panel di EFSA nella sua valutazione analitica dei fattori di rischio per la diffusione di MRSA nel sistema suinicolo europeo, secondo la quale i suini portatori inapparenti sono una fonte di contagio, soprattutto per le categorie professionalmente esposte, potendo anche rappresentare l'origine di cicli epidemiologici interumani.

Per quanto specificamente riguarda gli allevamenti, sia da riproduzione sia da ingrasso, le dimensioni e numerosità dei capi sono un fattore d'incremento del rischio, ovviamente correlato all'aumento numerico dei contatti infettanti tra gli animali e con l'uomo; inoltre, tutte le azioni condizionanti, di natura infettiva o manageriale che diminuiscono la reattività immunitaria possono favorire la replicazione batterica, aumentare l'eliminazione e amplificare le cariche infettanti.

È dunque indispensabile verificare la presenza dell'infezione, oltre che nei veterinari, nelle categorie occupazionalmente esposte, come allevatori, addetti di allevamento, trasportatori, macellatori e sezionatori, valutando il tempo di contatto, la sua continuità e la ciclicità, ma anche considerando tempi e modalità di sopravvivenza di *S. aureus* negli ambienti di lavoro; ugualmente importante sarebbe valutare il rischio del personale addetto alle preparazioni mangimistiche, considerando tempi e frequenza di contatto con le preparazioni a base di antibatterici.

In ogni caso, è possibile affermare che le indagini sull'epidemiologia interspecifica di MRSA possono avere una funzione dirimente nella comprensione delle correlazioni tra esposizione professionale e rischio biologico; rivedere la definizione di quest'ultimo alla luce della progressiva selezione dei cloni batterici circolanti e della modificazione evolutiva delle antibiotico-resistenze negli ambiti occupazionali di cui la suinicoltura intensiva fa parte, deve rappresentare l'indispensabile "contributo veterinario" alla prospettiva "One Health" della gestione sanitaria.

Perciò, solo un approccio interdisciplinare realmente “integrato”, al quale possano liberamente contribuire medici e veterinari potrà precisare l’importanza, spesso sovrastimata e altrettanto frequentemente ignorata, delle infezioni animali rispetto alla salute individuale e sociale dell’uomo.

BIBLIOGRAFIA

- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2014). Epidemiologia interspecifica di MRSA nell’ambito suinicolo. Atti XL Meeting Annuale SIPAS. 197-2013.
- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2014). Interspecific epidemiology of MRSA in Pig Farming. Infectious Diseases and Therapy. 2:2. <http://dx.doi.org/10.4172/2332-0877.1000135>.
- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2015). Presenza di MRSA nei partecipanti al meeting SIPAS 2014. Atti XL Meeting Annuale SIPAS. 209-216.
- EFSA, Biohazard Panel (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part A: MRSA prevalence estimates. EFSA Journal 2009; 7(11):1376.
- EFSA, Biohazard Panel (2009). Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008. Part B: factors associated with MRSA contamination of holdings. EFSA Journal 2010; 8(6):1597.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

**POPOLAZIONE MICROBICA NEI CEREALI:
INDAGINE SU DIFFERENTI TIPI DI CEREALI PROVENIENTI
DA DIVERSE AREE GEOGRAFICHE**

***MICROBIAL POPULATION IN CEREALS: SURVEY OF DIFFERENT
CEREAL TYPES AND GEOGRAPHICAL LOCATIONS***

BAZZOLI A.¹, BRAVO DE LAGUNA F.², BRUNE F.², COUTURE V.², SAORNIL D.²

¹Lallemand Animal Nutrition, Italy - ²Lallemand Animal Nutrition, France

Parole chiave: Cereali, fermentazione, broda.

Key words: Cereals, fermentation, liquid feed.

Riassunto: Un totale di 66 campioni di tre tipi di cereali (mais, orzo e frumento), provenienti da differenti nazioni Europee sono stati analizzati per la microbiologia, secondo le procedure standard. E' stata osservata una variabilità molto elevata tra i differenti profili microbiologici, e in generale, tra le popolazioni microbiche analizzate, quella dei lattobacilli (LAB) era quella meno rappresentata, mentre la popolazione degli enterobatteri era molto alta. Tra le tipologie di cereali, l'orzo ha mostrato la più alta conta microbica totale e di enterobatteri in comparazione con frumento e mais. Il rapporto tra Log LAB : Log Enterobatteri è risultato inferiore a 1 per tutti e tre i tipi di cereale, e il rapporto medio più basso è stato osservato per l'orzo. Considerando l'origine geografica dei campioni, è stato osservato che i campioni provenienti dal Nord Europa, sono 10 volte più contaminati rispetto a quelli provenienti dal Centro e dal Sud Europa. Inoltre, il rapporto tra Log LAB : Log Enterobatteri è risultato inferiore per i campioni del Nord Europa, mentre maggiore in quelli del Sud Europa. In una seconda fase di questo progetto, sono stati selezionati 6 campioni (2 per tipo di cereale), in base al loro profilo microbiologico e successivamente sottoposti a fermentazione al fine di studiarne lo sviluppo microbiologico e per valutare l'effetto dell'aggiunta di un inoculo a base di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M sul profilo microbico.

Abstract: A total of 66 samples representing three different cereals (corn, barley and wheat) were collected in several countries across Europe. The samples were analyzed by standard microbiological procedures and characterized according to their microbial profile. There was a great variability between the microbial profile of the whole set of cereal samples. In general, the survey showed a low population of Lactic Acid Bacteria (LAB), while a much higher population of Enterobacteria. Between cereal types, the survey showed a higher total microflora level in barley samples as compared with wheat and corn, and the same pattern was found in the Enterobacteria level. The ratio Log LAB:Log Enterobacteria was found to be below 1 in the three cereals, the lowest average level found in the barley samples. Sorting by geographical origin of the samples, those coming from Northern Europe were found to host 10 times more microorganisms than those coming from Central and South Europe. The ratio Log LAB:Log Enterobacteria was found to be the lowest in the samples coming from North of Europe, and the highest in the samples coming from South of Europe. In a second step of this project 6 samples were selected according to their microbial profile and subjected to fermentation in order to study the microbial development depending on the initial microbial load and also the effect of the application of an inoculant based on *Pediococcus acidilactici* MA18/5M.

INTRODUZIONE

Nell'alimentazione del suino all'ingrasso, il ricorso all'alimento liquido è diffuso e praticato in diversi paesi Europei. Questo tipo di somministrazione dell'alimento può essere ricondotto a due tipologie: alimento liquido non fermentato e alimento liquido fermentato. Il primo consiste nella miscela di materie prime secche, per la maggior parte cereali, con acqua e/o materie prime liquide e distribuito agli animali nell'arco di pochi minuti dalla preparazione. L'alimento liquido fermentato invece, prima di essere distribuito, viene lasciato fermentare per almeno 24 ore, al fine di aumentare la produzione di acido lattico e di abbassare la carica dei batteri potenzialmente patogeni [1,3,4,5]. Questo livello elevato di umidità innesca l'attività della flora microbica presente nelle materie prime ed i prodotti di queste fermentazioni microbiche possono essere molto variabili in base al tipo di microrganismi presenti nei vari componenti del mangime.[2,6]. La qualità igienica dell'alimento liquido può essere stimata valutando la sua carica microbica, un parametro molto importante ma spesso sottovalutato o ignorato[3,4,5].

La qualificazione batteriologica di una broda generalmente avviene attraverso l'analisi di:

- Lattobacilli: generalmente dominanti nella microflora epifitica dei cereali, essi hanno un generale effetto positivo producendo acido lattico, favorendo l'acidificazione progressiva dell'alimento liquido ed entrano rapidamente in competizione con la flora potenzialmente patogena nella vasca di preparazione [5], nel biofilm presente nell'impianto di distribuzione e anche a livello intestinale. E' importante tenere in considerazione tutto ciò poiché la qualità microbiologica di una broda è misurata sia in termini di quantità assoluta di ogni singola popolazione ma anche attraverso le relative proporzioni tra di esse. Per esempio, un alimento liquido molto ricco in lattobacilli contrasterà efficacemente un elevato numero di coliformi[5,9].

- Flora Gram negativa: tra questi generalmente vengono analizzati gli Enterobatteri, i Coliformi (una sottopopolazione degli Enterobatteri) e *Escherichia coli*, alcuni ceppi dei quali possono essere patogeni. I batteri Gram negativi sono importanti poiché sono in grado di produrre ammine biogene a partire da aminoacidi liberi. La produzione di queste ammine, potenzialmente tossiche, può avere effetti sull'ingestione di alimento ed influenzare la crescita degli animali, anche per la riduzione del livello di lisina nella broda [12].

- Lieviti: sono naturalmente presenti sulla superficie dei cereali [3] e possono colonizzare i biofilm. Il quantitativo di lieviti presenti può influenzare la qualità dell'alimento liquido. Quando le fermentazioni sono dominate dai lieviti sono stati riportati effetti sia positivi sia negativi, in funzione dei ceppi presenti [10,13]. Un'elevata concentrazione di lieviti può portare alla produzione di sapori e odori sgradevoli dovuti alla produzione di composti quali acido acetico, etanolo e alcool amilico che possono diminuire sia l'appetibilità sia il contenuto di sostanza secca ed energetico dell'alimento[8,11].

Lo scopo di questo studio era valutare la qualità microbiologica di differenti tipi di cereali, più comunemente utilizzati nell'alimentazione del suino e conseguentemente prevedere eventuali effetti positivi o negativi di questi sull'alimento liquido.

MATERIALI E METODI:

Lo studio si è svolto nel Febbraio 2016 presso il laboratorio di ricerca e sviluppo di LALLEMAND ANIMAL NUTRITION, sito in Blagnac, Francia.

L'indagine ha riguardato l'analisi di tre tipi di cereali, per un totale di 66 campioni, così suddivisi: 31 di orzo, 22 di frumento e 13 di mais. Inoltre, i campioni, sono stati prelevati in diverse regioni Europee: 15 campioni dal Nord Europa (Danimarca, Norvegia e Svezia), 37 da Europa centrale (Germania, Ungheria, Francia del Nord e Romania) e 14 campioni dal Sud Europa (Croazia, Italia e Sud della Francia). Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologica secondo le procedure standard per: Conta microrganismi aerobi totali

a 30°C (NF EN ISO 4833-1), Coliformi fecali (NF V 08-060), Enterobatteriacee a 37°C (NF V 08-054), Lattobacilli (ISO 15214), Lieviti (NF V 08-036) e Muffe (NF V 08-036).

In una seconda fase, come studio preliminare, al fine di valutare l'influenza della flora epifitica dei cereali, sull'evoluzione fermentativa dell'alimento liquido, sono stati selezionati 2 campioni per ogni tipo di cereale. I campioni sono stati scelti in base al livello di flora totale e di enterobatteri, scegliendo quelli con la concentrazione più alta (Bassa qualità) e quelli con la concentrazione più bassa (Alta Qualità). I 6 campioni sono stati duplicati al fine di valutare anche l'effetto di un probiotico utilizzato come inoculo a base di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M. I campioni selezionati sono poi stati macinati con tritatore da laboratorio al fine di ottenere una polvere fine ed omogenea per poi essere miscelati con acqua ricreando due brode per ogni cereale selezionato: una senza aggiunta di *Pediococcus acidilactici* (342.86 g di cereale in 1200 ml di acqua) denominata "controllo" e una con aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M (342.85 g di cereale + 1.58×10^{10} UFC/g in 1200 ml di acqua).

Un campione di 1 litro di ciascuna broda è stato inserito in un contenitore di vetro e posto in un contenitore per bagno maria, a temperatura controllata di $25 \pm 1^\circ \text{C}$ e lasciato fermentare per 24 ore. Le brode sono poi state analizzate microbiologicamente, all'inizio, a 3, 6 e 24 ore del test. Per le analisi sono state utilizzate le procedure microbiologiche standard per: Conta microrganismi aerobi totali a 30°C (NF EN ISO 4833-1), Coliformi fecali (NF V 08-060), Enterobatteriacee a 37°C (NF V 08-054), Lattobacilli (ISO 15214), Lieviti e Muffe (NF V 08-036) e *Pediococcus acidilactici* (ISO 15214).

Per l'analisi statistica è stato applicato il metodo GLM univariato.

RISULTATI E DISCUSSIONI:

Analisi dei 66 campioni:

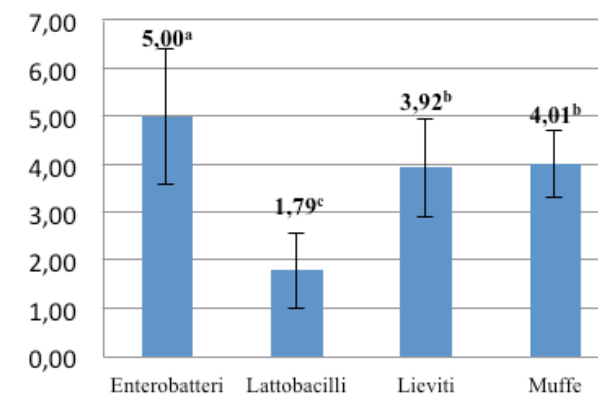


Fig. 1: Popolazione microbica media dei 66 campioni di cereali espresse in Log ($p < 0.001$).

I dati riportati in figura 1 rappresentano la media delle diverse popolazioni microbiche dei 66 campioni analizzati. Come si può osservare le differenze tra queste sono significative, e la popolazione microbica dominante è rappresentata dagli enterobatteri. Invece, la popolazione meno rappresentata è risultata essere, quella dei lattobacilli mentre lieviti e muffe, statisticamente equivalenti tra di loro erano presenti ad un livello intermedio rispetto alle altre due popolazioni ($p < 0.001$). Inoltre è interessante osservare che, tra i differenti campioni, c'è molta variabilità, ad esempio, gli enterobatteri variano da 10^2 UFC/g a 10^7 UFC/g mentre i lattobacilli (LAB) variano da 10^0 UFC/g a 10^4 UFC/g (Fig.2).

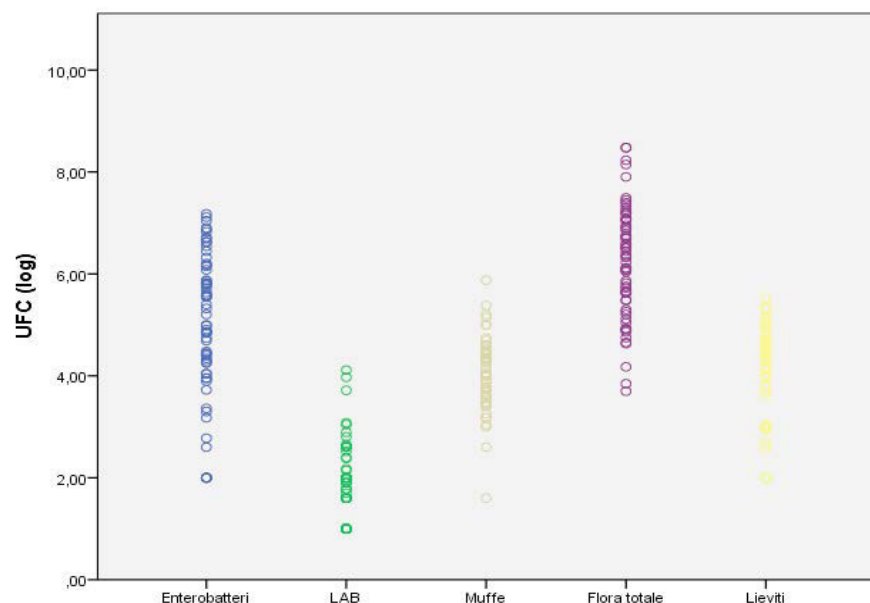


Fig. 2: Distribuzione delle conte batteriche dei 66 campioni di cereali.

Distribuzione per tipo di cereale

Variabili dipendenti	Cereale	Popolazione media (in Log)	Err. Stand.	P value
Flora Totale	Orzo	6,920 ^a	0,154	<0.001
	Mais	5,195 ^c	0,238	
	Frumento	5,939 ^b	0,183	
Enterobatteri	Orzo	5,891 ^a	0,171	<0.001
	Mais	3,101 ^c	0,264	
	Frumento	4,879 ^b	0,203	
LAB	Orzo	2,045 ^a	0,134	0.040
	Mais	1,548 ^b	0,207	
	Frumento	1,578 ^b	0,159	
Muffe	Orzo	4,152	0,122	0.194
	Mais	4,005	0,189	
	Frumento	3,804	0,145	
Lieviti	Orzo	4,267 ^b	0,169	0.003
	Mais	3,174 ^a	0,26	
	Frumento	3,876 ^b	0,2	

Tab. 1: Popolazione microbica media dei 66 campioni in funzione del tipo di cereale.

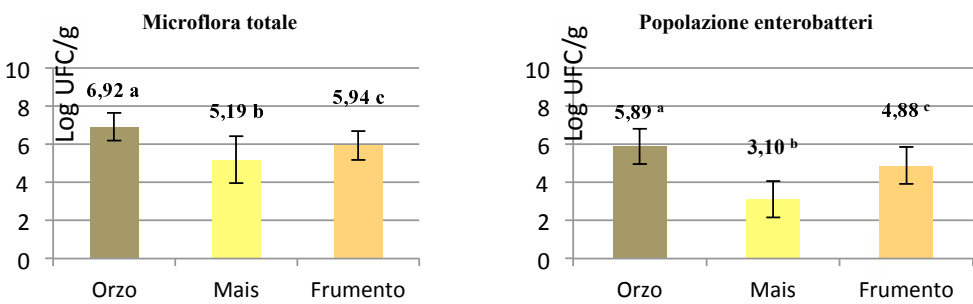


Fig. 3: Microflora totale e conta enterobatteri nei 66 campioni per tipo di cereali (p<0.001).

I tre cereali sono risultati significativamente differenti tra loro e, considerando la popolazione microbica totale, l’orzo risulta essere quello maggiormente contaminato, seguito dal frumento e dal mais. Le stesse differenze sono riscontrabili anche per gli enterobatteri (Fig.3), con almeno 3 Log di differenza tra orzo e mais (p<0.001). Per quanto riguarda i lattobacilli, nell’orzo la contaminazione è significativamente maggiore (vedi Tab. 1) rispetto a frumento e mais, mentre tra questi ultimi non vi sono differenze. Comunque sia, è interessante notare che per i lattobacilli, la differenza tra i campioni è minima con mezzo logaritmo di differenza massimo. Nella preparazione delle brode è auspicabile favorire lo sviluppo di abbondante flora lattica, la quale è in grado di contrastare la crescita dei patogeni sia per competizione sia creando un ambiente sfavorevole grazie alla produzione di AGV con conseguente abbassamento del pH [2,6,7]. Al fine di valutare l’equilibrio tra le varie popolazioni ed in qualche modo determinare il “livello di rischio” dei cereali, abbiamo analizzato il rapporto tra batteri lattici, ed enterobatteri, potenzialmente negativi. Tutti i rapporti, calcolati come “Log LAB / Log Enterobatteri”, sono risultati inferiori a 1 e ciò sta ad indicare che in ogni cereale la popolazione degli enterobatteri è dominante rispetto ai LAB (Tab. 2). Il mais è risultato avere un rapporto significativamente maggiore rispetto a frumento ed orzo (p<0.01), e su una ipotetica scala di rischio può essere considerato meno esposto a disfermentazioni, mentre l’orzo può essere considerato quello più a rischio.

Tipo	Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri	Err. Stand.	P value
Orzo	0,358 ^b	0,032	0.010
Mais	0,526 ^a	0,050	
Frumento	0,341 ^b	0,038	

Tab. 2: Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri in funzione del tipo di cereali. Distribuzione per aree

I 66 campioni sono stati divisi in 3 gruppi, in funzione della loro origine geografica e i risultati delle analisi sono rappresentati nella tabella 3.

Variabili dipendenti	Area	Popolazione media (in Log)	Err. Stand.	P value
Flora Totale	Nord Europa	7,183 ^a	0,252	<0.001
	Centro Europa	6,013 ^b	0,160	
	Sud Europa	5,891 ^b	0,261	
Enterobatteri	Nord Europa	6,270 ^a	0,319	<0.001
	Centro Europa	4,746 ^b	0,203	
	Sud Europa	4,332 ^b	0,33	
LAB	Nord Europa	1,847	0,199	0.314
	Centro Europa	1,676	0,127	
	Sud Europa	2,039	0,206	
Muffe	Nord Europa	4,448 ^a	0,163	0.002
	Centro Europa	3,767 ^b	0,104	
	Sud Europa	4,169 ^a	0,169	
Lieviti	Nord Europa	4,714 ^a	0,239	0.001
	Centro Europa	3,626 ^b	0,152	
	Sud Europa	3,852 ^b	0,247	

Tab. 3: Popolazione microbica media dei 66 campioni in funzione dell'origine geografica.

Osservando le medie delle 5 popolazioni microbiche nelle tre aree geografiche, è stato possibile trovare differenze significative per 4 di esse: microflora totale, enterobatteri, muffe e lieviti. E' interessante osservare, come queste 4 comunità microbiche, seguano lo stesso modello. Infatti, il Nord Europa è risultato essere significativamente più contaminato rispetto ai campioni delle altre regioni. Invece, i campioni del Centro Europa hanno mostrato delle contaminazioni solo numericamente maggiori per microflora totale ed enterobatteri rispetto a quelli del Sud Europa. Riguardo alla popolazione dei LAB, non vi sono differenze statisticamente significative tra le tre regioni, sebbene il Sud Europa sembrerebbe esserne numericamente più dotato.

Area	Rapporto Log LAB / Log Enterobatteri	Err. Stand.	P value
Nord Europa	0,293 ^b	0,030	0.020
Centro Europa	0,384 ^b	0,047	
Sud Europa	0,489 ^a	0,049	

Tab. 4: Rapporto LogLAB / Log Enterobatteri in funzione dell'origine geografica.

Valutando il rapporto Log LAB / Log Enterobatteri anche per origine geografica, è stato possibile osservare che tale rapporto nel Sud Europa è significativamente maggiore rispetto alle altre due macro regioni: ciò significa che nel Sud Europa, l'equilibrio microbico è a favore dei lattobacilli, pur restando, come per le altre regioni, inferiore a 1 (Tab.4).

Seconda fase del progetto. Esempio dell'evoluzione fermentativa nell'orzo.

Nella seconda fase di questa indagine, come studio preliminare, è stato eseguito un test di fermentazione su 2 campioni per ogni tipo di cereale per valutare l'evoluzione fermentativa dell'alimento liquido. Di seguito, a titolo di esempio, riporteremo i risultati riguardanti un orzo di "scarsa qualità".

Nell'orzo definito di "scarsa qualità", dopo aver costituito la rispettiva broda, la popolazione degli enterobatteri, già da T0 era la popolazione dominante (Enterobatteri: $2,7 \times 10^6$ ufc/g; LAB: $3,9 \times 10^4$ ufc/g, Lieviti e Muffe: $3,1 \times 10^4$ ufc/g) ed il trend si è mantenuto fino alla fine del processo. A 24 ore il rapporto tra le differenti popolazioni microbiche era ampiamente a favore degli enterobatteri (Enterobatteri: $1,4 \times 10^8$ ufc/g; LAB: $3,0 \times 10^7$ ufc/g, Lieviti e Muffe: $8,7 \times 10^6$ ufc/g) (fig. 5).

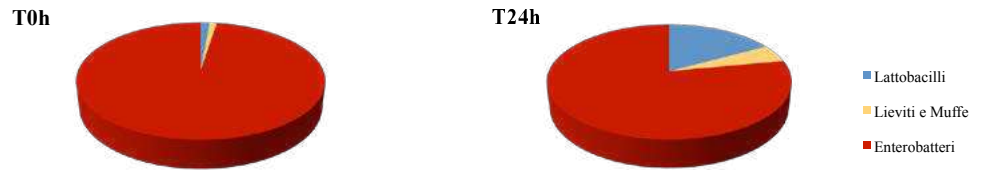


Fig. 5: Evoluzione della popolazione microbica della broda di un orzo di scarsa qualità da 0 a 24 ore.

Nella stessa broda, nonostante la popolazione degli enterobatteri fosse dominante a T0, l'aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M ha cambiato radicalmente il profilo microbico già dall'inizio del processo, bilanciando il rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri (Enterobatteri: $2,5 \times 10^6$ ufc/g; LAB: $1,9 \times 10^6$ ufc/g, Lieviti e Muffe: $2,1 \times 10^4$ ufc/g). Alla fine del processo, il profilo microbico è risultato completamente invertito: i lattobacilli infatti erano dominanti (Enterobatteri: $6,3 \times 10^6$ ufc/g; LAB: $5,9 \times 10^9$ ufc/g, Lieviti e Muffe: $4,1 \times 10^5$ ufc/g) (Fig. 6).

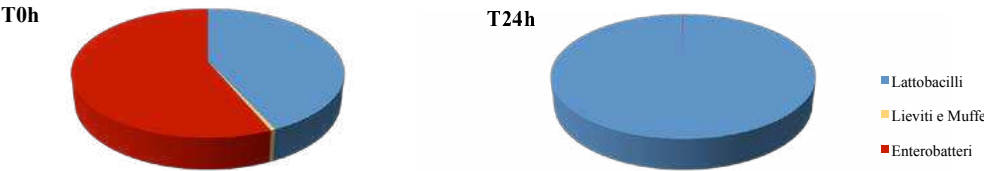


Fig. 6: Evoluzione della popolazione microbica della broda di un orzo di scarsa qualità da 0 a 24 ore con l'aggiunta di *Pediococcus acidilactici* MA18/5M.

CONCLUSIONI:

Le popolazioni microbiche presenti sulla superficie dei cereali sono risultate molto variabili tra di loro e questo rende difficile predire la qualità microbiologica di quest'ultimi. Tra i differenti tipi di cereali, l'orzo è risultato il più contaminato e sembrerebbe essere quello più a rischio, a causa della più alta popolazione di enterobatteri e per il minor rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri.

Il rapporto tra lattobacilli ed enterobatteri è un parametro importante che può essere

utilizzato per definire la qualità microbiologica dei cereali. Per i differenti cereali analizzati nell'indagine, il rapporto è risultato a favore della popolazione degli enterobatteri per tutti e tre i cereali, mostrando un potenziale rischio di disfermentazioni nell'alimento liquido ma anche nei tubi o successivamente nella creazione del biofilm dell'impianto di alimentazione. E' altresì da sottolineare, che il mais sembrerebbe essere il cereale a minor rischio rispetto ad orzo e frumento.

Geograficamente, i campioni provenienti dal Nord Europa hanno mostrato una qualità microbiologica inferiore rispetto a campioni provenienti dal Centro e Sud Europa.

Per ovviare al rapporto negativo tra lattobacilli ed enterobatteri, l'applicazione di un inoculo probiotico, *Pediococcus acidilactici* MA18/5M, come mostrato in un esempio sull'orzo, pare essere uno strumento efficiente per bilanciare il profilo microbico di differenti materie prime già dall'inizio del processo fermentativo. Comunque sia, essendo un test preliminare, ulteriori ricerche devono essere svolte in questo campo, per confermare i dati ottenuti.

BIBLIOGRAFIA:

1. Brooks P.H., Beal J.D. (2005), "Liquid feeding of pigs: implication for pig and human health", Proceedings of the 2005 Manitoba Swine Seminar
2. Brooks P.H., Beal J.D., Niven S. (2001), "Liquid feeding of pigs: potential to reducing environmental impact and for improving productivity and food safety", Recent advance in animal nutrition in Australia Vol. 13, 49-63.
3. Brooks, P.H. (2008) "Fermented liquid feed for pigs", CAB rev; 3, n° 73, 18.
4. Canibe, N., Jensen, B.B. (2003) "Fermented and non-fermented liquid feed to growing pigs: effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance". J Anim Sci.; 81, 2019-31.
5. Canibe, N., Jensen, B.B. (2012) "Fermented liquid feed – microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases of pigs" Anim. Feed Sci. Technol.; 173, 17-40.
6. Dujardin M., Elain A., Lendormi T., Le Fellic M., Le Treut Y., Sire O. (2014), "Keeping under control a liquid feed fermentation process for pigs: A reality scale pilot based study", Animal Feed Science and Technology, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.04.017>
7. Fantinati P. (2008), "Così l'alimentazione liquida difende la salute dei suini", Suinicoltura 2, 40-46.
8. Jensen, B.B., Mikkelsen, L.L. (1998) "Feeding liquid diets to pigs". In: Garnsworthy PC, Wiseman J, editors. Recent advances in animal nutrition 1998. Nottingham University Press, Nottingham, UK; 107-26.
9. Le Treut Y. (2010), «Principes et intérêts de la soupe fermentée en alimentation porcine», Comunicazione personale.
10. Missotten, J., Michiels, J., Olyn, A., De Smet, S., Dierick, N.A. (2010) "Fermented liquid feed for pigs", Arch. Anim. Nutr., 64, 437-66.
11. Missotten, J., Michiels, J., Degroote, J., De Smet, S. (2015) "Fermented liquid feed for pigs: an ancient technique for the future" Journal of Animal Science and Biotechnology, 6:4.
12. Niven, S.J., Beal, J.D., Brooks, P.H. (2006) "The effect of controlled fermentation on the fate of synthetic lysine in liquid diets for pigs". Anim Feed Sci Technol.; 119:304-315.
13. Olstorp M., Karin L., Lindberg J.E., Schnurer J., Passoth V. (2008), "Population diversity of lactic acid bacteria in pig fermented with whey, wet wheat distillers' grains or water at different temperatures", Appl. Environ. Microbiol. vol. 74 n° 6, 1696-1703.

RELAZIONE TRA STATO CORPOREO DELLA SCROFA E SUE PERFORMANCE: UNO STUDIO PRELIMINARE

RELATIONSHIP BETWEEN BODY CONDITION OF SOW AND ITS PERFORMANCE: A PRELIMINARY STUDY

AVANZINI C¹., CORINO C.², ROSSI R.², SUPERCHI P.³, SABBIONI A.³.

¹ Libero professionista – Cremona – Italy; ² Università degli Studi di Milano – Milano – Italy;

³Università degli Studi di Parma – Parma- Italy

Parole chiave: spessore del grasso dorsale, spessore del muscolo dorsale

Keywords: back fat, back lean

RIASSUNTO

Per questo studio è stato misurato con ecografo lo spessore del grasso e del muscolo di 214 scrofe provenienti da 4 diversi allevamenti del bacino padano, selezionati sulla base di gestioni manageriali similari.

Tali misurazioni sono state fatte sulle medesime scrofe in due momenti cruciali: al parto e allo svezzamento, per valutare la differenza dello stato corporeo della scrofa tra l'inizio e la fine della lattazione.

Quindi sono stati raccolti tutti i dati produttivi delle singole scrofe nel ciclo in cui sono state rilevate le misurazioni ecografiche e in quello successivo; tutto ciò per evidenziare eventuali correlazioni tra lo spessore di grasso e muscolo dorsali e le performance delle scrofe.

E' stato preso in esame il rapporto muscolo dorsale/grasso dorsale (MSD/GRD), mai considerato in bibliografia. Il rapporto MSD/GRD al parto è inversamente proporzionale al numero di suinetti nati totali e nati vivi; quindi se lo spessore di muscolo è molto elevato rispetto al grasso, la scrofa partorerà meno nati totali e vivi. Altamente significativo risulta essere anche il rapporto tra MSD/GRD allo svezzamento e il numero di suinetti svezzati nonché quelli nati nel ciclo successivo. Quindi minore è il rapporto MSD/GRD, ossia maggiore è lo spessore del grasso rispetto al muscolo dorsali, più numerosi saranno i suinetti svezzati e quelli partoriti nel successivo ciclo.

Concludendo, l'ipertrofia muscolare comporta risultati produttivi negativi.

ABSTRACT

For this study we selected 214 sows from 4 commercial herds in Po valley. For each sow, we measured back fat and back lean (Agroscan Noveko AC 037L, 3.5 MHz) on site P2 at farrowing and at weaning.

Performances data for each sow has been registered.

We consider the ratio between back lean and back fat, never evaluated in literature before.

This ratio at farrowing is inversely proportional to number of born alive and total born piglets. Therefore if body muscle is high in comparison with body fat, sows will farrow less piglets.

The ratio at weaning is proportional to number of weaned piglets and to number of total born piglets in the next farrow. Therefore if body fat is high in comparison with body muscle, sows will wean more piglets and farrow more piglets in the next parity.

In conclusion the muscular hypertrophy is a cause of negative performances.

INTRODUZIONE

Nei mammiferi, la gestazione è un evento non essenziale nella vita della femmina e subordinato al raggiungimento di un equilibrio metabolico mentre la sopravvivenza della

prole, vale a dire la lattazione è un evento prioritario. E' importante quindi che la scrofa, all'entrata in gravidanza, per evitare la perdita della stessa, sia in buone condizioni corporee. E' ormai noto infatti che la condizione corporea delle scrofe condizioni il tasso di portata al parto e la sopravvivenza embrionale (Close e Mullan, 1996; Vanderhaeghe et al., 2013). Ma dopo il parto è inevitabile che per sostenere la produzione di latte le scrofe ad elevata prolificità vadano incontro ad uno spiccato processo catabolico. Al termine della lattazione, gli effetti negativi di una eccessiva mobilitazione delle riserve corporee si possono avere, sia sulla ripresa dell'attività ciclica, sia successivamente, sullo sviluppo fetale (Whittemore, 1996).

Alla luce di ciò è chiaro come diventi di centrale importanza il controllo e la corretta gestione delle riserve adipose e muscolari, per preservare una buona condizione corporea della scrofa al fine di favorirne la produttività.

MATERIALI E METODI

Lo studio, iniziato nella primavera del 2014 e terminato nell'estate del 2015, ha interessato 214 scrofe provenienti da 4 allevamenti situati nella Pianura Padana. Gli allevamenti sono stati scelti sulla base delle finalità produttive (allevamento a ciclo chiuso), del management aziendale (rispetto delle norme sul benessere animale e sulla biosicurezza, gestione in bande, condizioni igieniche) e della diversa base genetica. L'ordine di parto (medio $\pm$ d.s.) delle scrofe all'inizio dell'indagine è stato di $3,98 \pm 2.23$ (all. 1), $2,76 \pm 2.05$ (all. 2), $4,19 \pm 2,31$ (all. 3) e $2,81 \pm 2,43$ (all.4). Le scrofe di 5° parto e oltre sono state considerate come unico gruppo. Nell'individuazione degli allevamenti in cui effettuare l'indagine non si è tenuto conto del n. di scrofe /allevamento che è risultato piuttosto variabile, oscillando da un massimo di 2000 (all.1) soggetti ad un minimo di 370 (all.2).

Le genetiche allevate sono tutte iperprolifiche, l'83% delle scrofe prese in analisi sono LWxL, il 4% LW, il 4% LWxLWxL e il 9% L.

Le scrofe, poste in gabbie singole, sono state fecondate artificialmente con il seme di verri acquistato dai centri genetici.

Nel rispetto del Dlgs 122/11 che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini (G.U. Serie Generale n. 178 del 2 agosto 2011), le riproduttrici sono rimaste per i primi 28 d di gestazione nelle gabbie da fecondazione e dopo l'avvenuta diagnosi di gravidanza, sono state spostate in box multipli fino a una settimana prima del parto. A questo punto, dopo un accurato lavaggio sono state trasferite in sala parto. Il management alimentare ha previsto, durante l'intero ciclo riproduttivo, l'utilizzo della broda somministrata in due pasti durante la giornata, mediante impianti automatizzati.

Durante la fase di gestazione, in tutti gli allevamenti venivano somministrati 3 kg/d di farina, mentre in lattazione veniva seguita una curva crescente nei primi 12 giorni, per poi assestarsi sui 6-6.5 kg/d nelle successive settimane.

In tutti i casi i mangimi sono stati formulati sulla base dei fabbisogni medi delle scrofe in relazione alla fase del ciclo come riportato da NRC (1998).

Le scrofe avevano sempre a disposizione acqua ad libitum.

Essendo in presenza di soggetti geneticamente iperprolifici, in tutti gli allevamenti è stata effettuata l'assistenza al parto. Entro le prime 4-6 ore dal parto sono state fatte le adozioni dei suinetti in base alla numerosità e peso delle nidiare e all'ordine di parto della scrofa. Il numero medio di suinetti da allattare per scrofa è stato pari a 11.

Il periodo di lattazione è durato mediamente $25 (\pm 5)$ giorni.

I rilievi effettuati su ciascuna scrofa hanno riguardato la raccolta dei dati produttivi e riproduttivi; tra i primi il n. di suinetti nati, nati vivi, morti e svezzati, tra i secondi l'intervallo svezzamento-concepimento ed il numero di suinetti nati al parto successivo. Inoltre sono state effettuate le misurazioni a livello del punto P2 (65 mm lateralmente

la linea mediana del dorso, a livello dell'ultima costa) dello spessore del grasso dorsale e del *M. Longissimus dorsi*. Tali misurazioni sono state condotte sempre dallo stesso operatore, con la scrofa in stazione quadrupedale, al parto e allo svezzamento, utilizzando AGROSCAN NOVEKO AC 037L ultrasound scanner, Echo Control Medical (ECM), Angoulême (France), munito di sonda lineare da 3,5 MHz e come mezzo di contatto olio di semi alimentare, che permette di ottenere un'ottima qualità dell'immagine senza bisogno di tosare l'animale.

I dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza utilizzando la procedura GLM (SAS 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC 2012), prevedendo come fattori fissi di base l'allevamento, la base genetica e l'ordine di parto della scrofa nonché la stagione in cui sono stati condotti i rilievi. Nella valutazione dello spessore del muscolo e del grasso allo svezzamento, il numero di suinetti svezzati per scrofa è stato utilizzato come covariata.

Prima di procedere all'analisi dei parametri produttivi e riproduttivi il campione è stato suddiviso in classi relativamente allo spessore del grasso dorsale (GRD), allo spessore del muscolo dorsale (MSD) e al rapporto MSD/GRD denunciati dalle scrofe al parto e allo svezzamento. La suddivisione in 4 classi è avvenuta considerando, per ogni rilievo, la media generale e la relativa deviazione standard (classe 1: < alla media - 1 volta la d.s.; classe 2: media-1 d.s.; classe 3: media + 1 d.s.; classe 4: > alla media + 1 d.s.). A seconda dei parametri da analizzare tali classi sono state introdotte come fattori fissi. I dati riportati in tabella sono presentati come media dei minimi quadrati ed errore standard della media. Inoltre è stato calcolato l'indice di correlazione di Pearson tra l'adiposità e muscolosità delle scrofe al parto ed allo svezzamento ed i parametri produttivi e riproduttivi rilevati. Differenze con $P < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative mentre con $P < 0.10$ sono state ritenute indicative di una associazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nonostante l'indagine sia stata effettuata in allevamenti per certi versi simili dal punto di vista manageriale le differenze gestionali comunque esistenti hanno fatto sì che il fattore "allevamento" abbia influenzato significativamente ($P < 0.05$) la condizione nutrizionale e l'efficienza produttiva e riproduttiva delle scrofe (dati non riportati nelle tabelle).

Come si evince dalla tabella 1, i ceppi genetici non influiscono sulle riserve adipose e proteiche delle scrofe, probabilmente perché la variabilità genetica al giorno d'oggi negli allevamenti intensivi è limitata.

I valori più bassi di grasso e muscolo al parto, si ritrovano nelle secondipare, così come lo spessore più basso di grasso dorsale allo svezzamento; in quest'ultima fase invece lo spessore di muscolo dorsale è molto simile in tutti gli ordini di parto.

Dal 3° parto lo spessore di grasso dorsale è sempre elevato, così come indicato da Young, 2004.

In accordo con Knox e Zas, 2001, i risultati ottenuti indicano che il grasso non è influenzato dalla stagione. Il muscolo sembra invece essere basso nei mesi autunnali e invernali, quando le ore di luce sono poche. Sappiamo infatti che il fotoperiodo è in grado di influenzare molti elementi fisiologici tramite la secrezione della melatonina. Questo ormone regola, tra l'altro, l'Insuline-like Growth Factor (IGF-I), che interviene nel metabolismo proteico. E' avallata quindi l'ipotesi di diversi Autori (Weiler et al., 1996; Martelli G. et al., 2014) secondo cui l'aumento della secrezione di melatonina al diminuire delle ore di luce e il conseguente calo dell'IGF-I è responsabile della minore sintesi muscolare.

Secondo i dati riportati in tabella 2 e tabella 3, non ci sono correlazioni statisticamente significative tra le classi di adiposità e muscolosità e i suinetti nati totali, nati vivi e svezzati; tali correlazioni non sono emerse nemmeno con l'ISCU (intervallo svezzamento-

primo calore utile), così come indicavano nel 2000 Guedes et al. E' stato considerato anche il rapporto muscolo dorsale/grasso dorsale (MSD/GRD), mai preso in esame precedentemente dalla letteratura scientifica, perché buone performance produttive e riproduttive sottostanno al benessere fisico generale della scrofa, e non a specifici valori assoluti di grasso o muscolo dorsali. I risultati sono presentati nei seguenti grafici e nella tabella 4.

Le scrofe secondipare mostrano un rapporto MSD/GRD elevato, ciò denota un basso tenore di grasso, tipico di animali ancora immaturi, che in seguito ad una prima gravidanza e successiva lattazione in tenera età, senza aver ancora completato lo sviluppo fisico, hanno innescato un processo di catabolismo delle già scarse riserve adipose che si è irrimediabilmente protratto anche nella seconda gravidanza.

Il rapporto MSD/GRD si capovolge dopo il 3° parto, ossia quando la scrofa raggiunge la piena maturità fisica.

Tale rapporto risulta essere basso, sia al parto, che allo svezzamento, in autunno e in inverno, stagioni con poche ore di luce; mentre è sempre alto in estate, ciò avvala di nuovo la tesi secondo cui il metabolismo muscolare è influenzato dal fotoperiodo, ma probabilmente testimonia anche il fatto che il grasso in estate è basso perché le scrofe perdendo appetito a causa del caldo, dimagriscono.

La tabella 4 mostra un importante risultato statisticamente significativo: il rapporto MSD/GRD al parto è inversamente proporzionale al numero di suinetti nati totali (P=0,035) e al numero di suinetti nati vivi (P=0,047), quindi se lo spessore di muscolo è molto elevato rispetto al grasso, la scrofa partorirà meno nati totali e vivi.

C'è una correlazione inversamente proporzionale, ma non una significatività anche con il numero di suinetti svezzati.

Altamente significativo risulta essere anche il rapporto MSD/GRD allo svezzamento e il numero di suinetti svezzati (P=0,005) nonché quelli nati nel ciclo successivo (P=0,040). Minore è il rapporto MSD/GRD, ossia maggiore è lo spessore di grasso rispetto al muscolo più numerosi saranno i suinetti svezzati e quelli partoriti nel successivo servizio.

Infatti anche il valore di grasso dorsale allo svezzamento risulta essere significativamente correlato in positivo al numero di suinetti svezzati, mentre il valore dello spessore di muscolo allo svezzamento è inversamente correlato (senza significatività) al numero di svezzati.

Inoltre c'è una associazione positiva tra lo spessore di grasso al parto e il numero di suinetti nati totali e svezzati.

CONCLUSIONI

Alla luce di tali risultati concludo sostenendo che, come ha scritto nel 2005 Foxcroft, probabilmente il fattore di rischio “chiave” per quanto riguarda la scarsa efficienza della scrofa, è il muscolo, che in caso di ipertrofia comporta risultati produttivi negativi.

Ciò è un problema emergente, poiché le attuali genetiche sono ipermuscolose (Solignac, 2010). Infatti si può affermare che esiste una nuova sindrome, “sindrome della scrofa ipermuscolosa” (Solignac e Martineau, 2010 a; Foxcroft, 2005) come conseguenza indiretta della selezione genetica per la deposizione di muscolo e l’iperprolificità. In quanto sindrome, causa conseguenze a diversi livelli, come sul parto, sulla prolificità e sulla efficienza lattifera della scrofa.

La misurazione ecografica dello spessore del grasso e del muscolo dorsali, può aiutare ad avere un’indicazione dello stato del parco scrofe, con lo scopo di calibrare le formulazioni del mangime, in modo da controllare la sintesi di tessuto muscolare.

Diventa fondamentale però considerare il rapporto MSD/GRD e non il valore assoluto di muscolo o grasso; infatti è lo stato generale della scrofa ad influire sulla sua attività.

Tabella 1 Fattori che influenzano il deposito lipidico e muscolare a livello dorsale (media ± ES)
Table 1 Factors affecting the level of backfat and backlean

	Parto		Svezzamento		Δ parto-svezzamento	
	MSD	GRD	MSD	GRD	MSD	GRD
Ceppo genetico						
L	54.22 ± 1.65	19.46 ± 1.08	46.61 ± 1.57	16.39 ± 0.99	7.59 ± 1.70	3.07 ± 1.01
LW	55.76 ± 2.07	18.24 ± 1.37	49.15 ± 1.98	14.54 ± 1.25	6.59 ± 2.13	3.71 ± 1.28
LWL	52.42 ± 0.61	19.23 ± 0.41	46.42 ± 0.59	15.49 ± 0.37	5.99 ± 0.63	3.74 ± 0.38
LWLWL	52.91 ± 2.23	18.21 ± 1.47	46.67 ± 2.13	14.91 ± 1.34	6.23 ± 2.29	3.31 ± 1.37
Ordine parto						
1	55.19 ± 1.39c	17.81 ± 0.92ab	45.79 ± 1.34	14.73 ± 0.85ab	9.36 ± 1.44c	3.11 ± 0.87
2	51.78 ± 1.13a	16.91 ± 0.74a	46.47 ± 1.07	13.84 ± 0.68a	5.31 ± 1.16ab	3.07 ± 0.69
3	52.07 ± 1.47ab	20.44 ± 0.97c	47.05 ± 1.41	15.79 ± 0.89bc	4.99 ± 1.52a	4.66 ± 0.91
4	54.74 ± 1.46abc	19.44 ± 0.97bc	48.24 ± 1.40	16.21 ± 0.88bc	6.48 ± 1.51bc	3.24 ± 0.90
>5	55.35 ± 1.08c	19.31 ± 0.71bc	48.49 ± 1.03	16.09 ± 0.65bc	6.85 ± 1.16bc	3.23 ± 0.66
Stagione						
Primavera	55.03 ± 1.11b	19.10 ± 0.73	47.98 ± 1.05b	15.70 ± 0.67	7.07 ± 1.14	3.40 ± 0.68
Estate	53.07 ± 1.46ab	17.92 ± 0.97	47.49 ± 1.40b	14.14 ± 0.88	5.56 ± 1.51	3.79 ± 0.90
Autunno	57.49 ± 2.23bc	19.09 ± 1.47	49.15 ± 2.13b	15.89 ± 1.34	8.32 ± 2.30	3.21 ± 1.37
Inverno	50.11 ± 1.35a	18.45 ± 0.89	42.96 ± 1.28a	15.69 ± 0.81	7.15 ± 1.38	3.20 ± 0.83

MSD: spessore del muscolo *M. Longissimus dorsi* (punto P2); GRD: spessore del grasso dorsale (punto P2)

MSD: back lean (on site P2); GRD: back fat (on site P2)

a,b diversi per P<0.05 a,b different for P<0.05

Tabella 2 Performance produttive delle scrofe suddivise in classi di adiposità (GRD) e muscolosità (MSD) al parto.

Table 2 Performaces of sows classified according to level of back fat and back lean at farrowing

	Nati totali	Nati vivi	Svezzati
GRD al parto			
- < 15 mm	11.20 ± 1.07	9.92 ± 1.00	9.73 ± 0.81
- 15 - 19 mm	11.63 ± 0.80	10.88 ± 0.75	9.75 ± 0.60
- 19.1 - 23 mm	11.17 ± 0.93	10.48 ± 0.87	10.92 ± 0.70
- > 23 mm	12.08 ± 1.10	11.56 ± 1.04	10.02 ± 0.83
MSD al parto			
- < 47 mm	12.16 ± 1.01	11.79 ± 0.95	10.47 ± 0.76
- 47.1 - 52.7 mm	11.31 ± 0.74	10.61 ± 0.70	9.95 ± 0.56
- 52.8 - 58.4 mm	11.53 ± 0.79	10.53 ± 0.74	10.43 ± 0.59
- > 58.4 mm	10.87 ± 0.89	9.93 ± 0.84	9.57 ± 0.67
MSD/GRD al parto			
- < 2.2	10.94 ± 1.25	10.34 ± 1.16	10.35 ± 0.94
- 2.2 - 2.9	11.17 ± 0.75	10.64 ± 0.68	9.58 ± 0.57
- 3.0 - 3.6	12.58 ± 0.79	11.68 ± 0.78	10.16 ± 0.60
- > 3.6.	11.10 ± 1.42	10.50 ± 1.35	10.31 ± 1.07

MSD: spessore del muscolo M. *Longissimus dorsi* (punto P2); GRD; spessore del grasso dorsale (punto P2)

MSD: back lean (on site P2); GRD: back fat (on site P2)

Tabella 3 Performance riproduttive delle scrofe suddivise in classi di adiposità (GRD) e muscolosità (MSD) allo svezzamento.

Table 3 Performaces of sows classified according to level of back fat and back lean at weaning.

	Int. svezz – concepimento	Nati totali al parto successivo
GRD allo svezzamento		
- < 11.9 mm	4.46 ± 5.97	13.27 ±1.35
- 11.9 – 15.4 mm	6.10 ± 4.38	12.40 ± 0.99
- 15.5 – 18.9 mm	10.72 ± 4.50	11.12 ± 1.02
- > 18.9 mm	7.72 ± 5.65	12.29 ± 1.28
MSD allo svezzamento		
< 41.3 mm	10.44 ± 4.86	12.31 ± 1.10
41.3 – 46.9 mm	9.31 ± 3.79	11.83 ± 0.86
47.0 – 52.5 mm	5.68 ± 4.26	12.59 ± 0.93
> 52.5 mm	5.63 ± 5.05	12.34 ±1.14
MSD/GRD allo svezzamento		
< 2.3	4.00 ± 6.89	12.31 ± 1.56
2.3 – 3.2	11.34 ± 3.82	13.42 ± 0.86
3.3 – 4.1	6.31 ± 4.16	13.03 ± 0.94
> 4.1	7.55 ± 7.19	10.31 ± 1.63

MSD: spessore del muscolo M. *Longissimus dorsi* (punto P2); GRD; spessore del grasso dorsale (punto P2)

MSD: back lean (on site P2); GRD: back fat (on site P2)

Grafico 1 Rapporto MSD/GRD al parto ed allo svezzamento in relazione all'ordine di parto
Figure 1 Evolution of backfat/backlean ratio at farrowing and at weaning according to parity

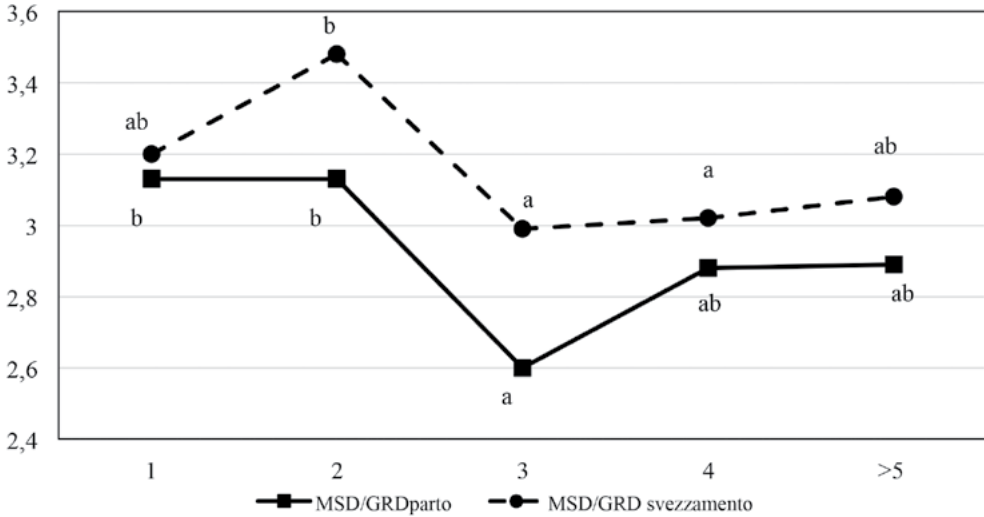
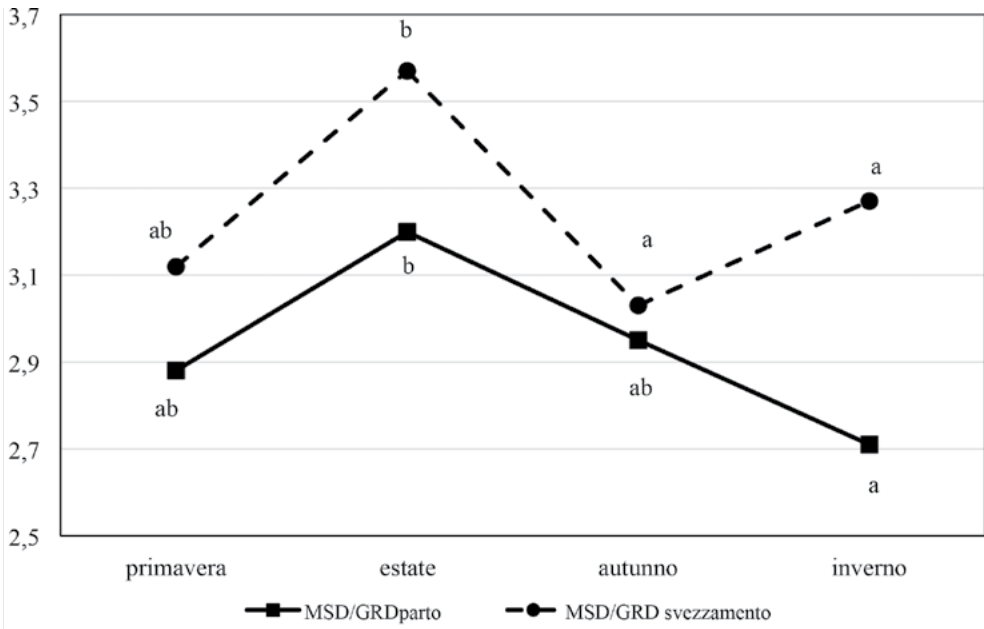


Grafico 2 Rapporto MSD/GRD al parto ed allo svezzamento in relazione alla stagione del ciclo produttivo
Figure 2 Evolution of backlean/backfat ratio at farrowing and at weaning according to season



a,b diversi per P<0.05
a,b different for P<0.05

Tabella 4 Correlazioni tra adiposità e muscolosità ed i parametri produttivi e riproduttivi
Table 4 Correlation between back fat and back lean and performances

	Nati totali	Nati morti	Nati vivi	n. svezzati	Intervallo svezz.-concep.	Nati totali parto successivo
GRD parto	0.122 0.08	0.069 0.333	0.101 0.156	0.136 0.054	-0.075 0.331	0.135 0.081
MSD parto	0.006 0.933	0.063 0.373	-0.023 0.744	0.013 0.805	-0.066 0.394	0.038 0.629
MSD/GRD parto	-0.150 0.035	-0.047 0.505	-0.141 0.047	-0.132 0.064	0.043 0.579	-0.103 0.185
GRD svezz.				0.169 0.017	-0.042 0.590	0.104 0.181
MSD svezz.				-0.116 0.101	-0.034 0.665	-0.089 0.257
MSD/GRD svezz.				-0.196 0.005	0.034 0.662	-0.159 0.040

MSD: spessore del muscolo M. Longissimus dorsi (punto P2); GRD; spessore del grasso dorsale (punto P2)

MSD: backlean (on site P2); GRD: backfat (on site P2)

BIBLIOGRAFIA:

1. Boccuzzi R. Effetti del fotoperiodo artificiale sul benessere e sulle prestazioni produttive del suino pesane italiano. PhD thesis 2010. Università degli Studi di Bologna, Scienze della nutrizione e degli alimenti

2. Brisbane JR and Chesnais JP. Relationship between backfat and sow longevity in Canadian Yorkshire and Landrace pigs. 1996 In Proc. NSIF Ann. Mtg. Vol. 21

3. Close WH, Mullan BP. Nutrition and feeding of breeding stock. World Animal Science, Pig Production (ed. MR Taverner & AC Dunkin). Ch.8 pp. 169-202. Elsevier Science Ltd, Amsterdam, Netherlands

4. Clowes EJ, Aherne FX, Foxcroft GR, Baracos VE. Selective protein loss in lactating sows is associated with reduced litter growth and ovarian function. J. Anim. Sci.2003. 81: 753-764

5. Clowes EJ, Aherne FX, Schaefer AL, Foxcroft GR, Baracos VE. Parturition body size and body protein loss during lactation influence performance during lactation and ovarian function at weaning in first parity sows. J. Anim. Sci. 2003. 81. 1517-1528

6. Decreto Legislativo n. 122/2011. Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini. G.U. Serie Generale n. 178 del 2 agosto 2011
7. Esbenshade KL, Britt JH, Armstrong JD, Toelle VD, Stanislaws M. Body condition of sows across parities and relationship to reproductive performance. *J. Anim. Sci.* 1986. 62: 1187-1193
8. Ferronato G. Influenza della condizione corporea della scrofa sul peso e la variabilità ponderale dei suinetti alla nascita. Tesi di laurea 2013. Università degli Studi di Parma, dipartimento di Scienze medico veterinarie
9. Foxcroft G, Beltranena E, Patterson J, Williams N. Recognizing the characteristics of our new dam lines. Allen D. Leman Swine Conference 2005; 130-138
10. Gaughan JB, Cameron RD, Dryden GM, Young BA. Effect of body composition at selection on reproductive development in large white gilts. *J Anim Sci* 1997, 75:1764-1772
11. Guedes R., Nogueira R. Relationship among body condition at parturition, decrease of backfat thickness and weight during the lactation and the interval from weaning to oestrus of sows. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol.37 n.1 São Paulo 2000
12. Hoffmann CL, Bilkei G. Effect of body condition of postweaning “flushed” sows and weaning – to mating interval on sow reproductive performance. *Vet Rec.* 2003. 152: 261-263
13. Houde AA, Méthot S, Murphy BD, Bordignon V, Palin MF. Relationships between backfat thickness and reproductive efficiency of sows: A two-year trial involving two commercial herds fixing backfat thickness at breeding. *Can. J. Anim. Sci.* 2010. 90: 429-436
14. Jindal R, Cosgrove JR, Aherne FX, Foxcroft GR. Effect of nutrition on embryo mortality in gilts: association with progesterone. *J Anim. Sci.* 1996. 74: 620-624
15. Jindal R, Cosgrove JR, Foxcroft GR. Progesterone mediates nutritionally induced effects on embryonic survival in gilts. *J. Anim. Sci.* 1997. 75: 1063-1070
16. Knox RV and Rodrigues Zas SL. Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound. *J. anim. Sci.* 2001. 79: 2957-2963
17. Lewis CRG, Bunter KL. Body development in sows, feed intake and maternal capacity. In Part 1: Performance, pre-breeding and lactation feed intake traits of primiparous sows animal, doi. 1011017/S1751731111001121.
18. Martelli G, Nannoni E, Grandi M, Bonaldo A, Zaghini G, Vitali M, Biagi G, Sardi L. Growth parameters, behavior, and meat and ham quality of heavy pigs subjected to photoperiods of different duration. *J. Anim. Sci.* 2014. 7906
19. Martineau GP, Badouard B. Managing highly prolific sows. London Swine Conference – Tools of the Trade 1-2 April 2009; 3-19
20. Martineau GP, Le Treut Y, Guillou D, et al. Postpartum dysgalactia syndrome: A simple change in homeorhesis? *J Swine Health Prod.* 2013;21(2):85-93
21. Martineau GP. Body building syndromes in sows. *Proc AASP.* Denver, Colorado. 1990; 345–348
22. Martineau GP. Postpartum dysgalactia syndrome and mastitis in sows. In: Aiello E, ed. *Merck Veterinary Manual.* 8th ed. Whitehouse Station, New Jersey: Merck and Co, Inc. 1998:1020–1024
23. NRC. 1998. Nutrient Requirements of Swine. 10th ed. Natl. Acad. Press, Washington, D.C.
24. Olivero C, Heinonen M, Valros A, Peltoniemi O. Environmental and Sow-related factors affecting the duration of farrowing. *Anim. Reprod. Sci.* 2010. 119 (1-2): 85-91
25. Oliviero C, Kokkonen T, Heinonen M, Sankari S, Peltoniemi O. Feeding sows with different amount of fibre during late pregnancy, farrowing and early lactation: Impact on the intestinal function, the energy balance and the litter. *Res Vet Sci.* 2009;86:314–319
26. Palomo Yague A. Aspetti nutrizionali e gestione dell'alimentazione nelle scrofe in lattazione. *Atti SIPAS* 2014; 57-65
27. Patterson JL, Ball RO, Willis HJ, Aherne FX, Foxcroft GR. The effect of lean growth rate on puberty attainment in gilts. *J Anim Sci* 2002. 80:1299-1310
28. SAS Inc., 2012. SAS® User's guide: statistics (version 9.4). SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA
29. Solignac T, Keita A, Pagot E, Martineau GP The over-muscled sow syndrome: a new emerging syndrome in a hyperprolific sow herds: Preliminary observations on farrowing duration. *Proc IPVS.* Vancouver, Canada. 2010:124
30. Solignac T, Martineau GP. The over-muscled sow syndrome: a new emerging syndrome in a hyperprolific sow herds: clinical consequences, preliminary observations. *Proc IPVS.* Vancouver, Canada. 2010:1174. Poster 868
31. Solignac T, Martineau GP. The over-muscled sow syndrome: a new emerging syndrome in a hyperprolific sow herds. Effect of back fat and back lean on prolificacy. *Proc IPVS.* Vancouver, Canada. 2010:1175. Poster 869
32. Tonon F., Rossetto G., Mazzoni C., Stelletta C. Relazioni tra lo spessore del lardo dorsale ed alcuni indici riproduttivi di scrofe. *Atti SIPAS* 2009; 513-519
33. Toplis P, Ginesi MFJ, Wrathhall AE. The influence of high food levels in early pregnancy on embryo survival in multiparous sows. *Anim. Prod.* 1983. 37: 45-48
34. Vanderhaeghe C, Dewulf J, De Kruif A, Maes D. Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: a review. *Animal Reprod. Sci.* 2013. 139: 76-88
35. Vinsky MD, Novak S, Dixon WT, Dyck MK, Foxcroft GR. Nutritional restriction in lactating primiparous sows selectively affects female embryo survival and overall litter development. *Reprod Fertil. Dev.* 2006. 18: 347-355
36. Weiler U, Claus R, Dehnhard M, Hofacker S. Influence of the photoperiod and light reverse program on metabolically active hormones and food intake in domestic pigs compared with wild boar. *Can. J. Anim. Sci.* 1996. 76: 531-539
37. Whittemore CT. Nutrition reproduction interactions in the primiparous sow. A review. *Livestock Prod. Sci.* 1996. 46: 65-83
38. Wientjes JGM. Piglet birth weight and litter uniformity: Importance of premating nutritional and metabolic conditions. PhD thesis, 2013, Wageningen Univ., Wageningen, the Netherlands, 240. p.
39. Young MG, Tokach MD, Aherne FX, Main RG, Dritz SS, Goodband RD, Nelssen JL. Comparison of three methods of feeding sows in gestation and the subsequent effects on lactation performance. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:3058-3070
40. Young MG, Tokach MD, Goodband R, Nelssen JL, Dritz SS. The relationship between body condition score and backfat in gestating sows. *Swine Day*, Manhattan, KS, November 15, 2001

ULCERE GASTRICHE NEL SUINO PESANTE ITALIANO: RILEVAZIONI AL MACELLO E IDENTIFICAZIONE DEI FATTORI DI RISCHIO

GASTRIC ULCERS IN ITALIAN HEAVY PIGS: MONITORING AT THE SLAUGHTERHOUSE AND IDENTIFICATION OF RISK FACTORS

BOTTACINI M.¹, GOTTARDO F.², SCOLLO A.¹

¹ *Suivet, Reggio Emilia, Italia;* ² *Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute,
Università degli Studi di Padova*

Parole chiave: ulcere gastriche, fattori di rischio, suini all’ingrasso

Key words: gastric ulcers, risk factors, fattening pigs

Riassunto

Le ulcere gastriche nel suino sono lesioni che hanno effetti rilevanti in termini di mortalità degli animali, e possono determinare un peggioramento degli indici produttivi nei soggetti subclinici. Lo studio ha avuto come obiettivo quello di valutare, attraverso la rilevazione al macello, la frequenza delle ulcere gastro-esofagee (OGU) nel suino pesante Italiano, affiancandovi un’analisi mirata ad individuare i fattori di rischio aziendali. Sono stati controllati 228 lotti per un totale di 22551 stomaci. Le lesioni sono state classificate utilizzando un metodo a punteggi che prevede una scala di 4 valori: da 0 (nessuna lesione) a 3 (ulcere gravi). Tutti gli stomaci sono stati esaminati anche per la presenza di lesioni cicatriziali. Per individuare i fattori di rischio è stato somministrato un questionario agli allevatori mirato a raccogliere la più vasta gamma di informazioni aziendali. Tutti i lotti controllati sono stati interessati da lesioni anche se con frequenze e gravità molto diverse tra di essi, dimostrando come esista una forte correlazione tra i punteggi e l’allevamento di provenienza. I risultati confermano da un lato la rilevanza del problema delle ulcere gastriche nei suini, dall’altro l’estrema variabilità di situazioni. Per quanto riguarda i fattori di rischio, la composizione della dieta e il digiuno sono stati confermati come cause importanti del problema, ma anche elementi legati alla stagione, alla struttura e alla gestione sono risultati avere delle responsabilità.

Abstract

Gastric ulcers have important effects in terms of animal mortality and can cause potential losses in terms of production performances in sub-clinical subjects. The study aimed to evaluate the frequency of oesophago-gastric ulcers (OGUs) in Italian heavy pigs through a post mortem inspection at the slaughterhouse, trying to identify the associated on-farm risk factors. In the study 228 batches for a total of 22.551 stomachs have been checked. The lesions were classified using a four value scoring system from 0 (no lesions) to 3 (severe ulcers). Scars frequency was checked too. Consequently a questionnaire was distributed to piggy owners to identify factors associated with high ulcer frequencies. All batches had lesions although with a wide range of prevalence and severity. 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 pigs, on the other the extreme variability of situations. Among risk factors dietary composition and fasting were confirmed as important causes of the problem, but also seasonal, structural and managerial factors have been demonstrated to play a role.

INTRODUZIONE

L'ulcera gastro-esofagea (OGU), così denominata per la localizzazione nello stomaco a livello di *pars oesophagoea*, è una problematica studiata ormai dagli anni 90' e che parallelamente all'intensivizzazione dell'allevamento è stata sempre più segnalata, venendo così classificata come tecnopatia [1]. La distribuzione mondiale del problema viene riportata al macello con diverse frequenze, suscettibili anche del metodo di punteggio. Campionamenti su larga scala riportano percentuali superiori al 30% [1] [2]. Il significato economico delle ulcere gastriche è stato dimostrato risiedere primariamente nella mortalità [3]. Considerare però solo questo aspetto porterebbe a sottostimare i costi, dal momento che la maggior parte delle volte vi è un decorso subclinico che può rendere inapparente un ritardo nell'accrescimento [4].

Il fattore più importante legato allo sviluppo di OGU è l'alimentazione, su cui si concentrano gli studi di gran parte della bibliografia, evidenziando come tutto ciò che incida su un rapido svuotamento gastrico, primariamente la ridotta granulometria del mangime, contribuisce ad aumentare la prevalenza del problema [4] [5]. Secondariamente altri aspetti legati più strettamente alla gestione, alla genetica, a cause infettive e a strategie terapeutiche, sono stati presi in considerazione dalla bibliografia, anche se i diversi autori vi attribuiscono pesi specifici spesso variabili.

Con questo studio si è inteso individuare la frequenza di ulcere gastro-esofagee all'esame *post mortem* in sede di macellazione di suini pesanti (170 kg) allevati e macellati nel Nord Italia, dal momento che il prolungamento del ciclo di ingrasso e le differenti genetiche utilizzate rispetto ad altri Paesi potrebbero incidere diversamente sul problema. Con la somministrazione di un questionario agli allevatori proprietari dei lotti di suini campionati, si è voluto inoltre valutare i fattori di rischio presenti in allevamento che possono incidere sulla patogenesi, garantendo informazioni aggiuntive allo studio epidemiologico.

MATERIALE E METODI

Per la rilevazione della frequenza di OGU sono stati campionati 22551 stomaci di suini pesanti (170 kg) nati e allevati nel Nord Italia. Le partite di stomaci erano suddivise in lotti riconducibili complessivamente a 120 allevamenti, dei quali 45 hanno avuto almeno 2 lotti campionati, sempre però in giornate diverse. In totale sono stati campionati 228 lotti di suini, costituiti ciascuno in media da 135 capi, e di questi sono stati esaminati mediamente 100 stomaci (max 115 e min 44).

La raccolta dati è stata svolta da un unico osservatore presso un macello con sede in Emilia Romagna, nell'arco di 14 giornate di campionamento distribuite tra marzo e settembre 2015. L'osservatore, studente all'ultimo anno di Medicina Veterinaria, è stato precedentemente formato attraverso la consultazione di materiale fotografico e mediante un training in catena di macellazione sotto la supervisione di un veterinario con esperienza nella valutazione delle lesioni gastriche. La velocità della catena di macellazione ha imposto un tempo di osservazione per ogni stomaco compreso tra i 7 e i 10 secondi. La rilevazione, a distanza di circa 10 minuti dal dissanguamento, avveniva dopo l'apertura meccanica semi-automatica degli stomaci lungo la grande curvatura e il loro lavaggio con acqua.

Le lesioni sono state classificate utilizzando un metodo di punteggio già utilizzato in altri studi [1] [6] che prevede una scala di 4 valori: 0 = nessuna lesione, mucosa liscia e di colore biancastro; 1 = ipercheratosi, mucosa 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 cicatriziali. Per determinare se vi fosse una correlazione tra OGU ed altre lesioni ai visceri sono stati raccolti i dati di 174 lotti di suini compresi tra quelli campionati per le ulcere, dei quali le rilevazioni su polmoni, pleure, fegato erano disponibili. L'esame dei polmoni, pleure, e fegati di ciascun animale è stato condotto da due veterinari formati per effettuare la valutazione mediante l'attribuzione di punteggi. Le

lesioni polmonari Mycoplasma-like sono state punteggiate utilizzando la griglia di Madec [7], 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 hyopneumoniae*. Le lesioni pleuriche sono state valutate utilizzando la griglia SPES [8], 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 d'organo per lotto è stato poi calcolato per ciascuna lesione.

La seconda fase dello studio ha previsto la somministrazione di un questionario agli allevatori proprietari dei lotti campionati, mirato ad identificare i fattori di rischio che in allevamento possono contribuire allo sviluppo di OGU. I questionari raccolti sono stati 20 (ognuno rappresentativo di un allevamento) sul totale dei 120 allevamenti campionati, corrispondenti a 44 dei 228 lotti esaminati. Nel questionario sono stati indagati il tipo e le caratteristiche strutturali dell'allevamento, la gestione, l'alimentazione, i trattamenti, la presenza di arricchimenti ambientali e i dati specifici di ogni singola banda di suini.

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 (suini scaricati e avviati alla macellazione vs suini sottoposti a digiuno prolungato con scarico nel tardo pomeriggio e macellazione il mattino seguente), il mese di macellazione (da marzo a settembre) 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 riconducibili a 45 allevamenti). Inoltre, per 30 lotti (tra quelli per cui è stato completato il questionario) di cui erano disponibili i dati sulla mortalità durante il ciclo di ingrasso, è stata calcolata la correlazione tra la frequenza dei singoli punteggi delle lesioni gastriche e la mortalità del lotto. Utilizzando i dati di 43 lotti riconducibili ai 20 allevamenti di cui è stato completato il questionario (17% degli allevamenti), è stata condotta un'analisi per l'identificazione dei fattori di rischio aziendali. I 43 lotti sono stati divisi in due gruppi: lotti "problema" quelli in cui la somma degli stomaci con punteggio 2 e 3 era superiore al 20%, e "non problema" quelli in cui invece la risultante era inferiore. Questa soglia è stata stabilita utilizzando l'approccio di Robertson et al. (2002). Un'analisi del rischio simile è stata condotta per la presenza di cicatrici, e la soglia stabilita come "problema" è stata arbitrariamente fissata al 15% sulla base della distribuzione statistica.

RISULTATI E DISCUSSIONE

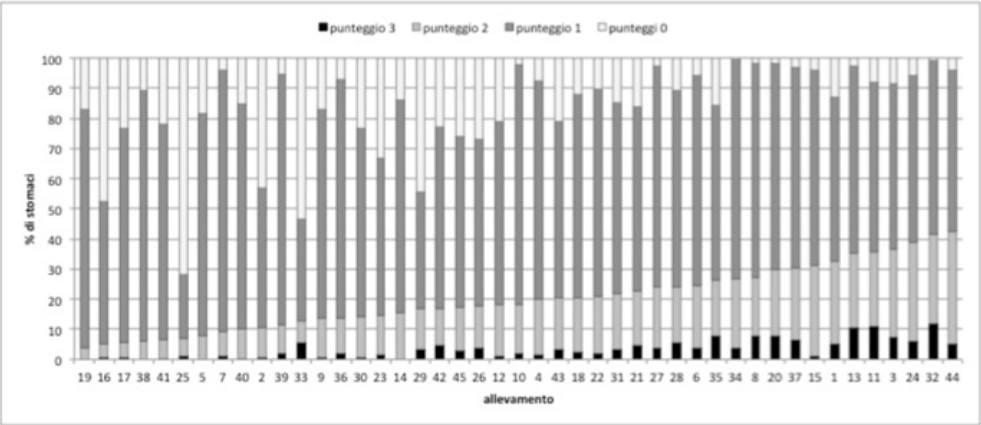
Nello studio è emerso che il 21% sul totale dei 22551 stomaci valutati è risultato positivo ad ulcera gastrica (punteggio 2 + punteggio 3), dato in linea con quelli ottenuti da diversi autori in altri Paesi [1] [2], confermando che anche nel panorama italiano del suino pesante il problema è estremamente diffuso (Tabella 1). È interessante evidenziare la forte variabilità nei punteggi tra un lotto e l'altro, anche se il punto comune è che nessuna delle partite controllate è risultata completamente priva di lesioni. Anche la presenza di cicatrici, che fornisce informazioni utili sulla presenza di ulcere croniche o di lesioni datate ormai guarite, rispecchia la stessa forte variabilità: il 7,46% dei lotti considerati aveva meno dell'1% degli stomaci interessati da cicatrici, mentre nei più colpiti queste alterazioni hanno interessato oltre il 50% degli stomaci esaminati.

Tabella 1. Percentuale media, massima e minima di stomaci attribuiti alle diverse classi di punteggio rilevate sui 228 lotti.

	Punteggio 0	Punteggio 1	Punteggio 2	Punteggio 3	Cicatrici
	% di stomaci				
media	17,1	62,4	16,5	4,1	12,6
massima	85,0	91,1	46,2	35,6	52,0
minima	0	11,3	0	0	0

Gli allevamenti che hanno avuto almeno 2 lotti campionati in giornate diverse (156 lotti riconducibili a 45 allevamenti) sono stati utilizzati per un’analisi della varianza che ha confermato come sia forte l’effetto dell’allevamento sui vari punteggi e sulle cicatrici ($P < 0,0001$). Come riportato in Figura 1, suini provenienti da un allevamento piuttosto che da un altro hanno dei punteggi con notevoli differenze, dimostrando come le diverse condizioni aziendali possano risultare determinanti sullo sviluppo di ulcere gastriche. La presenza di allevamenti con una prevalenza di ulcere e cicatrici molto bassa testimonia come questa tecnopatia sia potenzialmente controllabile e come quindi la comprensione delle cause possa portare a delle valide strategie di prevenzione.

Figura 1. Percentuali di stomaci ripartiti per classe di punteggio e per la presenza di cicatrici in relazione all’allevamento di provenienza.



Il tempo di digiuno è stato dimostrato incidere sull’aumento di OGU (Tabella 2) dal momento che il prolungamento della permanenza in stalla di sosta prima della macellazione (suini scaricati il pomeriggio e macellati il mattino seguente) determina una diminuzione degli stomaci privi di lesioni e un aumento delle ulcere lievi corrispondenti al punteggio 2, avvalorando quanto riportato in altri studi [9] [10]. Anche il mese di macellazione sembra incidere sulla frequenza di lesioni gastriche (Tabella 3), dal momento che nel periodo giugno-agosto aumentano percentualmente le lesioni con punteggio 1 e con cicatrici, con le prime che potrebbero essere ricondotte allo stress termico durante le fasi di movimentazione e trasporto, e le seconde che più verosimilmente sono legate a fattori predisponenti in allevamento, dal momento che rispecchiano una fase temporale precedente.

Tabella 2. Percentuali di stomaci ripartiti per classe di punteggio e per presenza di cicatrici in funzione del tempo di digiuno prima della macellazione.

		Digiuno prolungato		RSME	Sign.
		NO	SI		
punteggio 0	% 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	1,0	0,13	ns

ns: $P > 0,05$; ***: $P < 0,001$

Tabella 3. Percentuali di stomaci ripartiti per classe di punteggio e per la presenza di cicatrici in relazione al mese di macellazione.

		mese di macellazione							RSME	Sign.
		3	4	5	6	7	8	9		
punteggio 0	% stomaci	10,7	7,9	6,1	7,6	5,7	8,2	6,5	2,68	ns
punteggio 1	“	50.3 ^b	60.4 ^{ab}	59.2 ^{ab}	66.2 ^a	68.1 ^a	65.3 ^a	64.0 ^{ab}	14,36	***
punteggio 2	“	17.4 ^{ab}	17.6 ^{ab}	21.3 ^a	14.9 ^{ab}	14.6 ^b	12.7 ^b	19.3 ^{ab}	8,72	***
punteggio 3	“	4.8 ^a	3.0 ^{ab}	3.4 ^a	1.9 ^b	2.5 ^{ab}	2.5 ^{ab}	2.2 ^{ab}	2,19	*
cicatrici	“	3.6 ^b	4.8 ^b	7.4 ^a	6.5 ^{ab}	7.2 ^a	7.7 ^a	6.6 ^{ab}	2,15	**
punteggio medio		0,98	1	1,03	0,91	1,03	1	1,03	0,13	ns

ns: $P > 0,05$; *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$

Prendendo in considerazione altre patologie come mostrato in Tabella 4 (in particolare quelle respiratorie) sono emerse deboli correlazioni positive tra il punteggio 3 (ulcera grave) e la presenza di cicatrici polmonari e di sequestri tissutali, mentre una debole correlazione negativa esiste con la percentuale di polmoni sani. Questa correlazione, seppur debole, contribuisce ad avvalorare un’associazione con le patologie respiratorie, come possibile conseguenza dell’anoressia e degli aumentati livelli di istamina dovuti all’infezione [11]. È interessante anche come dallo studio emerga una correlazione significativa, seppur debole, tra la frequenza di OGU e cicatrici gastriche con le lesioni epatiche causate dall’infestazione di ascaridi. Dal momento che l’infestazione parassitaria può causare infiammazione, risultando nel rilascio di istamina, esistono le condizioni per predisporre allo sviluppo di OGU [11]. Considerando inoltre i 30 lotti di cui si è reperito il dato sulla mortalità durante il ciclo di ingrasso, si è dimostrato come la mortalità aziendale abbia una forte correlazione positiva con la presenza di cicatrici sulla mucosa gastrica ($r^2 = 0,671$, $P < 0,0001$), avvalorando il significato cronico di queste lesioni, che possono rispecchiare più fedelmente la reale prevalenza di OGU in allevamento, dal momento che ulcere lievi possono svilupparsi anche nell’arco di 24 h. Dall’analisi dei fattori di rischio aziendali considerando le ulcere gastriche (punteggio 2 + 3) come si vede in Tabella 5 , emerge un risultato interessante che finora non è stato riportato in letteratura, ovvero l’associazione della profilassi antiparassitaria con una diminuzione del rischio di sviluppare OGU di circa 3 volte rispetto alle aziende che non la applicano ($P = 0,007$). Greve (2012) ha già riportato come effettivamente sia dibattuto il fatto che l’infestazione da *Hyostrogylus rubidus* possa contribuire nella patogenesi di OGU sulla mucosa ghiandolare

dello stomaco. A tal proposito risulta interessante la correlazione rinvenuta nel presente studio tra le ulcere gastriche e le lesioni epatiche imputabili ad ascaridi. Il risultato, sebbene necessiti di approfondimenti volti a confermare il dato a livello sperimentale, suggerisce un duplice vantaggio del trattamento antiparassitario, in quanto utile sia al controllo dei parassiti intestinali, che al miglioramento ulteriore dell'accrescimento e alla riduzione della mortalità derivante dalle OGU. La vaccinazione per *Mycoplasma hyopneumoniae* è risultata associata ad un aumento significativo nel rischio di ulcere gastriche ($P = 0,026$) mentre invece altre vaccinazioni (PCV2, APP) non sono risultate significative, ponendo questo risultato in contrasto con quanto riportato in bibliografia [4], dal momento che la prevenzione di patologie respiratorie dovrebbe risultare in una diminuzione della prevalenza di OGU. Tuttavia la vaccinazione, oltre a non essere completamente protettiva per l'intera durata del ciclo produttivo, potrebbe nascondere una situazione sanitaria in cui la pressione del patogeno è maggiore rispetto ad altre in cui non viene utilizzata.

Riguardo all'alimentazione non è stato possibile verificare due dei fattori di rischio maggiormente studiati, la granulometria del mangime e la sua somministrazione in forma pellettata [13] [5], dal momento che gli allevatori intervistati non hanno saputo fornire informazioni sulla granulometria utilizzata e l'alimentazione a broda è stato l'unico metodo di somministrazione adottato. Questa mancanza di dati sulla dimensione delle particelle alimentari denota come questa non sia percepita come un'informazione importante per la maggior parte degli allevatori. L'indagine sui fattori di rischio e una corretta comunicazione agli allevatori assumono quindi ulteriore importanza, auspicando che in futuro un'attenta analisi economica del problema possa aiutare a scegliere la granulometria più idonea alla situazione, dimostrando con i numeri se effettivamente convenga perdere un punto in resa e guadagnarne uno a discapito della mortalità. Analizzando i dati sulla dieta, frumento e orzo sono risultati associati ad una diminuzione del rischio nello sviluppo di OGU, nonostante fossero presenti in ridotte quantità rispetto al cereale prevalente, ovvero il mais, che seppure imprescindibile nel nostro territorio, anche in letteratura risulta quello a più alto rischio ulcerogenico, mentre l'orzo, in virtù di una maggiore stabilità strutturale e un più alto contenuto di fibra, assume un carattere preventivo [13].

Per quel che riguarda i fattori aziendali strutturali, il rischio associato al pavimento grigliato ($P = 0,044$) è stato riportato anche precedentemente [14], suggerendo come lesioni podaliche possano contribuire ad aggravare lo stato infiammatorio dei suini, con il rilascio di istamina che può determinare un aumento della prevalenza di OGU [4]. Lo stress correlato alla pavimentazione ma anche alla mancanza di arricchimenti ambientali non trova precedenti in letteratura come fattore di rischio, ma i risultati ottenuti suggeriscono come questi ultimi meritino ulteriori approfondimenti. Di Martino et al. (2013) avevano già dimostrato come l'ingestione giornaliera di piccole quantità di paglia contribuisse a diminuire la prevalenza di OGU, anche se in condizioni non sperimentali risulta difficile scindere la connotazione dietetica da quella di arricchimento ambientale. Con questo studio trova conferma anche il possibile ruolo preventivo di oggetti manipolabili quali ad esempio catene ed oggetti di plastica posizionati all'interno del box.

I rimescolamenti successivi all'accasamento sono risultati associati ad un aumento del rischio di lesioni cicatrizzate (Tabella 6): il cambio di gerarchie ad essi dovuto determina un maggiore stress e una maggiore competizione per l'accesso all'alimento, risultando in una minore ingestione (se non addirittura nel digiuno) per i soggetti che subiscono la dominanza di altri suini.

CONCLUSIONI

Questo studio rappresenta la prima valutazione su larga scala della prevalenza di OGU nel suino pesante italiano, che si attesta sul 21%, ponendosi in linea con altri studi internazionali che hanno adottato metodi e numeri di campionamento comparabili. Le ulcere gastriche

vengono confermate essere una tecnopatia legata alle condizioni di allevamento, e il digiuno viene nuovamente riscontrato come una delle possibili cause. È stata inoltre evidenziata la possibilità di nuovi fattori di rischio di sicuro interesse precedentemente non riportati in letteratura. Questi meritano dunque ulteriori approfondimenti, tenendo conto che lo studio è stato condotto in condizioni di campo e non è stata possibile la valutazione dei singoli fattori in modo indipendente, non potendoli confrontare con un gruppo controllo avente le medesime condizioni di allevamento. Questo studio delinea l'ispezione al macello come uno strumento che in futuro potrà consentire un maggior controllo del rispetto del benessere animale, oltre che la trasmissione di informazioni all'allevatore relative allo visita ispettiva *post mortem*, in modo da poter valutare l'adeguatezza delle pratiche di allevamento adottate ed attuare strategie per il miglioramento delle stesse.

Tabella 4. Coefficienti di correlazione (Spearman Correlation) e relative significatività tra lesioni gastriche e lesioni derivanti da altre patologie.

	lesioni gastriche							
		punt. medio lesioni	punt. 2+3	punt. 0	punt. 1	punt. 2	punt. 3	cicatrici
% polmoni sani	r ²	-0.074	-0.127	0.014	0.052	-0.107	-0.155	-0.040
	P	0.330	0.095	0.855	0.494	0.162	0.041	0.600
% polmoni con lesioni gravi	r ²	0.052	0.094	-0.012	-0.021	0.079	0.133	0.071
	P	0.493	0.219	0.871	0.786	0.303	0.080	0.353
punteggio medio polmone	r ²	0.077	0.115	-0.025	-0.024	0.094	0.146	0.075
	P	0.310	0.132	0.739	0.756	0.219	0.055	0.325
% polmoni con cicatrici	r ²	0.104	0.092	-0.070	-0.004	0.058	0.150	0.108
	P	0.172	0.226	0.358	0.961	0.447	0.048	0.155
% polmoni con ascessi	r ²	0.122	0.153	-0.032	-0.083	0.129	0.142	-0.019
	P	0.108	0.043	0.672	0.279	0.090	0.062	0.805
consolidamento	r ²	-0.136	-0.065	0.173	-0.129	-0.066	-0.047	-0.008
	P	0.074	0.395	0.023	0.090	0.384	0.536	0.919
scacchiera	r ²	-0.012	0.059	0.033	-0.106	0.095	-0.021	0.030
	P	0.870	0.439	0.664	0.166	0.210	0.781	0.693
% pleure con lesioni gravi	r ²	-0.090	-0.123	0.032	0.060	-0.146	0.001	0.002
	P	0.237	0.105	0.676	0.433	0.054	0.987	0.981
punteggio medio pleure	r ²	-0.047	-0.070	0.018	0.050	-0.104	0.061	0.013
	P	0.534	0.360	0.813	0.509	0.173	0.421	0.861
% sequestri	r ²	0.072	0.092	-0.033	-0.019	0.057	0.152	-0.002
	P	0.347	0.230	0.667	0.808	0.452	0.046	0.981
indice APP	r ²	-0.052	-0.084	0.012	0.072	-0.116	0.047	0.007
	P	0.493	0.272	0.879	0.343	0.129	0.542	0.930
% fegati con lesioni gravi	r ²	-0.010	-0.020	-0.052	0.183	-0.019	-0.051	0.135
	P	0.895	0.796	0.499	0.016	0.804	0.501	0.076
% totale lesioni	r ²	0.042	0.016	-0.103	0.198	0.031	-0.056	0.177
	P	0.580	0.835	0.179	0.009	0.685	0.464	0.020
punteggio medio fegato	r ²	0.009	-0.014	-0.073	0.182	-0.005	-0.066	0.154
	P	0.908	0.851	0.341	0.016	0.943	0.386	0.043

Tabella 5. Fattori di rischio per elevata frequenza (> 20%) di ulcere (punt. 2+3) dall'analisi di 43 lotti di suini. I risultati vengono mostrati per tutte le misurazioni con P < 0.20 nell'analisi univariabile.

Fattore	Classificazione	N. lotti	> 20% ulcere (punt. 2+3)	P (χ^2 /Fisher)
tipologia allevamento	solo ingrasso	29	28	0.12
	ciclo chiuso	14	57	
dimensione allevamento (capi)	≤3 000	13	15	0.11
	>3 000	30	47	
genetica	goland	10	50	0.06
	duroc	15	13	
	danese	4	75	
	altri	14	43	
trattamenti antelmintici	no	17	65	0.007
	si	26	19	
vaccinazione per <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	no	18	17	0.026
	si	25	52	
uso di NSAIDS (N=41)	no	27	44	0.186
	si	14	21	
uso of acido acetilsalicilico (N=21)	no	12	42	0.178
	si	9	11	
frumento nella razione (N=37)	no	21	52	0.004
	si	16	6	
tipo di cereali nella dieta (N=38)	solo mais	2	100	0.002 ¹
	mais + frumento o orzo	24	46	
	mais + frumento + orzo	12	0	
provenienza alimento	produzione propria	30	27	0.067
	commerciale	13	61	
disponibilità acqua di bevanda	ad libitum	34	44	0.120
	razionata	9	11	
tipo di pavimentazione	grigliato	19	63	0.007
	parzialmente grigliato	18	17	
	pieno	6	17	
arricchimenti ambientali	nessuno	12	67	0.011
	legno o catene/plastica	11	45	
	legno e catene/plastica	20	15	
modalità di presentazione dell'arricchimento (N=31)	a terra	8	63	0.006
	sospeso	11	0	
	entrambi	12	25	

¹ Risk Ratio non calcolabile

Tabella 6. Fattori di rischio per elevata frequenza di cicatrici gastriche (> 15%) dall'analisi di 43 lotti di suini. I risultati vengono mostrati per tutte le misurazioni con P < 0.20 nell'analisi univariabile.

Fattore	Classificazione	N. lotti	% >15% cicatrici	P (χ^2 /Fisher)
rimescolamenti durante il ciclo di ingrasso	no	8	0	0.04 ¹
	si	35	40	
tipo di pavimentazione	grigliato	19	53	0.022
	parzialmente grigliato	18	11	
	pieno	6	33	
arricchimenti	nessuno	12	58	0.03
	legno o catene/plastica	11	36	
	legno e catene/plastica	20	15	
modalità di presentazione dell'arricchimento (N=31)	a terra	8	50	0.139
	sospesa	11	9	
	entrambi	12	16	
provenienza alimento	produzione propria	30	23	0.11
	commerciale	13	54	
disponibilità acqua di bevanda	ad libitum	34	41	0.02 ¹
	razionata	9	0	
trattamenti antelmintici	no	17	47	0.19
	si	26	23	

¹ Risk Ratio non calcolabile

BIBLIOGRAFIA

- 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.
- 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.
- Melnichouk S. I. (2002). Mortality associated with gastric ulceration in swine. *Can. Vet. J.*, 43, 3, 223-225.
- Friendship R.M. (2003). Gastric ulcers: An under-recognized cause of mortality and morbidity. *Advances In Pork Production, Vol 14*, 159-164.
- Cappai M. G., Picciau M., Pinna W. (2013). Ulcerogenic risk assessment of diets for pigs in relation to gastric lesion prevalence. *BMC veterinary research.* 9(1):595.
- 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
- Madec F., Derrien H. (1981) *Frequency, intensity and localization of pulmonary lesions in porker carcass. first series of observations in abattoirs france, respiratory diseases, ecopathology.* <http://agris.fao.org>.
- 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.* 2007;13:161-165.

9. 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.
10. 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.
11. Thomson J.R. and Friendship R.M. (2012). Digestive system. In *Diseases of swine, 10th edition* (eds. J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz and G.W. Stevenson), pp. 208-211.
12. Greve J.H. (2012). Internal parasites: helminths. In *Diseases of swine, 10th edition* (eds. J.J. Zimmerman, L.A. Karriker, A. Ramirez, K.J. Schwartz and G.W. Stevenson), pp. 908-920.
13. Nielsen E.K., Ingvarsen K.L. (2000) Effect of cereal type, disintegration method and pelleting on stomach content, weight and ulcers and performance in growing pigs. *Livest Prod Sci.* 66(3):271-282.
14. Amory JR., Mackenzie A.M., Pearce G.P. (2006). Factors in the housing environment of finisher pigs associated with the development of gastric ulcers. *The Veterinary Record.* 158, 260-264.

EFFETTI SULLA MORTALITÀ NEONATALE DELL'UTILIZZO DI TRE DIFFERENTI TIPOLOGIE DI GABBIE PARTO (STUDIO PRELIMINARE)

EFFECTS ON THE NEONATAL MORTALITY USING THREE TYPES OF FARROWING ROOMS (PRELIMINARY STUDY)

MAZZONI C.¹, SCOLLO A.¹, BERTOCCHI M.², PARMIGIANI E.², BRESCIANI C.²

¹Suivet®, Reggio Emilia, Italy; ²Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università degli Studi di Parma, Italy

Parole chiave: suinetti, gabbia parto, schiacciamento, mortalità neonatale

Key words: piglets, farrowing crate, crushing, neonatal mortality

Riassunto

La redditività di un allevamento suinicolo è strettamente dipendente dal numero di suinetti svezzati per scrofa/anno. Alla perdita dei soggetti contribuisce la natimortalità con un 7-8%, mentre la mortalità presvezzamento è responsabile di tali perdite per il 11-13%. Determinante per questo valore è sicuramente lo schiacciamento dei suinetti da parte della scrofa. Tuttavia, l'adeguata gestione della sala parto e l'implementazione delle strutture aziendali hanno permesso di ridurre l'incidenza degli schiacciamenti. Nel presente lavoro è stato indagato l'effetto dell'utilizzo di tre differenti tipologie di gabbie parto sul tasso di mortalità da schiacciamento nel corso dei primi tre giorni di vita dei suinetti. Nello studio sono stati inclusi 158 parti spontanei, così suddivisi: 51 parti in gabbie convenzionali (gruppo A), 47 parti in gabbie tipo *slide cage* (gruppo B) e 60 parti in gabbie tipo *balance cage* (gruppo C), per un totale di 2487 suinetti nati vivi. La mortalità da schiacciamento riportata dal gruppo C è stata pari allo 0.54%, mentre è stata pari a 2.37% e al 5.46% rispettivamente nel gruppo B ed A. Le differenze tra le percentuali del gruppo C rispetto ai valori del gruppo A (5.46%; $p < 0.001$; $\chi^2 = 36.90$) e B (2.37; $p = 0.003$; $\chi^2 = 8.81$) sono statisticamente significative. Si può quindi affermare di aver ottenuto una riduzione percentuale significativa e numerica per la mortalità da schiacciamento dei suinetti durante i primi tre giorni di vita.

Abstract

In pig production, the economic gain of saws unit is based on the number of weaning piglets/sow per year. The pre-weaning mortality is at least 11-13% of total losses in herds, compounded by 7-8% of stillbirths. The crushing of piglets by the sow continued to contribute significantly to the overall piglet mortality, even if the farm facilities and management have been improved. The aim of this preliminary study was to compare the effect on piglet crushing by the use of three different types of farrowing crates during the first three days of life. In our study 158 spontaneous deliveries were included randomly in the following groups: 51 in the conventional farrowing crates (group A), 47 in the slide cage type (group B) and 60 in the balance type (group C), for a total 2487 of piglets born alive. Crushing mortality reported by group C was 0.54%, while it was 2.37% and 5.46% respectively in group B and A. The differences between the percentages of group C compared with group A values (5.46%; $p < 0.001$; $\chi^2 = 36.90$) and B (2.37; $p = 0.003$; $\chi^2 = 8.81$) were statistically significant. In conclusion, the use of the *balance* farrowing crates allowed a significant reduction mortality crushing rates of the piglets during the first three days of life.

INTRODUZIONE

La mortalità neonatale è uno dei problemi più significativi nell'allevamento del suino ed è responsabile di ingenti perdite produttive, economiche e costituisce in sé un aspetto del benessere animale. Si verifica con maggior incidenza al parto e durante i primi giorni di vita dei suinetti (Cronin et al, 2000; Marchant et al, 2000; Andersen et al, 2009). Infatti, essi nel tentativo di raggiungere la mammella per ricevere nutrimento e calore si espongono necessariamente al rischio di essere schiacciati da parte della scrofa. Il fattore di rischio esiste proprio a causa di questa necessità, indispensabile per la sopravvivenza. Al fine di ridurre questo tipo di mortalità neonatale, la ricerca di strutture e dispositivi migliorativi è aumentata negli ultimi anni. Il tasso di mortalità presvezamento varia sensibilmente a seconda dell'allevamento e oscilla tra 11% e 13%, a cui precede un 7-8% di natimortalità (Kirkden et al, 2013). Lo schiacciamento dei neonati da parte della scrofa, insieme alla mancata assunzione di alimento, risulta essere l'aspetto preponderante del verificarsi della mortalità neonatale. A questi due elementi sono attribuiti il 50-80% dei decessi in sala parto (Jarvis et al, 2005; Andersen et al, 2005). Lo schiacciamento dipende da fattori che riguardano la scrofa, l'ambiente e il suinetto neonato. La morte per schiacciamento in genere si verifica quando la scrofa, alloggiata nella gabbia parto, cambia posizione passando dalla stazione quadrupedale al decubito orizzontale o dal decubito sternale a quello laterale. La tipica irrequietezza della madre al parto è un ulteriore fattore, che aumenta il rischio di schiacciamento, in particolare per i suinetti meno vitali e reattivi, che non sono in grado di reagire prontamente al cambio di posizione della stessa. Lo stress elevato della scrofa in azienda viene attribuito alla soppressione di comportamenti naturali, come la costruzione del nido (Damm et al, 2000), all'inadeguatezza della gabbia e al disturbo percepito dall'animale durante le attività degli operatori all'interno della sala parto (Fangman and Amass, 2007). Numerosi studi hanno dimostrato che la tendenza allo schiacciamento da parte della scrofa è correlata all'età dell'animale, all'ordine di parto e al tempo trascorso dall'inizio alla fine del parto (Jarvis et al, 2005). I soggetti nati da parti languidi mostrano una minore vitalità alla nascita e la probabilità che vengano schiacciati aumenta in misura importante. Nonostante la maggior parte delle gabbie parto siano dotate di aree dedicate ai suinetti, confortevoli e riscaldate con lampade ad infrarossi, i suinetti trascorrono i primi giorni di vita ed in particolare le prime 24h dopo il parto (Danholt et al, 2011) a contatto con la scrofa attirati da stimoli tattili, termici e olfattori (Vasdal et al, 2010). La sopravvivenza dei suinetti nelle prime fasi di vita è quindi il risultato di complesse interazioni tra la scrofa, l'ambiente e la nidiate. Nel tentativo di ridurre l'incidenza del fenomeno, sono state sviluppate numerose strategie di management in allevamento. Tra queste vi è la realizzazione di tipi di gabbie parto dotate di caratteristiche strutturali, per migliorare il benessere e ridurre la mortalità neonatale. Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare e confrontare l'effetto sulla mortalità da schiacciamento dei suinetti di tre tipologie di gabbie parto durante i primi tre giorni di vita del suinetto.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in una scrofaia intensiva della Pianura Padana dotata di tre tipologie di gabbie parto: convenzionale, tipo *slide cage* e tipo *balance*. La gestione riproduttiva della scrofaia prevede che le scrofe vengano spostate nelle sale parto 4-5 giorni prima della data presunta del parto e alloggiata nelle gabbie, divise per i 3 gruppi di osservazione. La gabbia parto *balance* è costituita da un box con un piano centrale e da due corridoi laterali destinati ai suinetti. I movimenti della scrofa vengono limitati da sbarre anti-schiacciamento e grazie ad un sensore viene attivato il sollevamento del piano centrale. Questo avviene quando la scrofa passa dal decubito laterale/sternale alla stazione quadrupedale. La scrofa in questo modo che si trova ad un livello superiore, che i suinetti non riescono a raggiungere. Viceversa, quando la madre passa dalla stazione al decubito, trovandosi, quindi, in una posizione di sicurezza, il sensore provoca l'abbassamento del piano per permettere ai suinetti di avvicinarsi

ed alimentarsi. La seconda gabbia *slide cage* è dotata di un "nido", rappresentato da un contenitore in acciaio posizionato ad un livello inferiore e posteriormente alla scrofa. In questo "nido" i suinetti scivolano, immediatamente dopo la fase espulsiva del parto, grazie alla presenza di un piano inclinato dedicato allo scopo. Due gradini permettono l'immediata risalita dei neonati più vitali dopo il parto.

Nella prova sono state incluse 158 femmine gravide che hanno prodotto altrettante nidiate, per un totale di 2487 suinetti nati vivi. Le scrofe gravide sono state suddivise in tre gruppi di osservazione: GRUPPO A (n=51) con gabbie parto tradizionali, GRUPPO B (n=47) con gabbie parto tipo *Slide cage* e GRUPPO C (n=60) con gabbie parto tipo *balance*. Tutti i soggetti arruolati nello studio erano allevati nelle medesime condizioni ambientali, manageriali ed alimentari ed i gruppi sono stati bilanciati in base all'ordine di parto (gruppo A= 3.39±1.98; gruppo B= 4±2.05; gruppo C= 4.08±1.79).

Attraverso una scheda singola per scrofa, sono stati raccolti i seguenti dati: numero identificativo, data del parto, il numero dei suinetti nati vivi, nati morti e mummificati. Nei tre giorni successivi al parto sono stati registrati: il numero e la causa dei decessi (schiacciamento, inedia, diarrea, cannibalismo o malformazioni). Il management aziendale per la sala parto non prevedeva l'induzione dei parti. L'analisi statistica volta ad evidenziare il tasso di mortalità dei suinetti nelle diverse tipologie di gabbie parto ed il confronto fra frequenze è stata condotta mediante il test Chi-quadro applicando la correzione di Yates.

RISULTATI

I risultati complessivi riguardanti il numero di suinetti morti per schiacciamento in ciascuna tipologia di gabbia sono riportati in Tabella 1.

Tabella 1: risultati ottenuti mediante l'utilizzo di tre tipologie di gabbie parto.

Suinetti	Gruppo A (convenzionale) (n=51)	Gruppo B (slide cage) (n = 47)	Gruppo C (balance) (n = 60)	Totale (n= 158)
Nati vivi (n.) media ±DS	879 17.2±2.5	676 14.4±4.8	932 15.5±4.5	2487
Schiacciati (n.)	48	16	5	69
Schiacciamento (%)	5.46 ^a	2.37 ^b	0.54 ^c	2.79

^{a, b, c} le percentuali differiscono in modo significativo.

Nelle nidiate appartenenti ai gruppi B e C è stata rilevata un'importante diminuzione della frequenza degli schiacciamenti per il periodo di riferimento preso in considerazione. In particolare, il tasso di mortalità per schiacciamento è stato pari allo 0.54%, nelle nidiate che hanno trascorso i tre giorni successivi al parto in gabbie tipo *balance* (gruppo B). Il confronto tra la % di schiacciamento riportata per il gruppo C è risultato statisticamente significativo sia rispetto alla percentuale di mortalità registrata con gabbie parto convenzionali (gruppo A: 5.56%; $P<0.001$, $Chi-square= 36.90$), che con quella riportata dal gruppo B con gabbie tipo *slide cage* pari al 2.37% ($P= 0.03$; $Chi-square= 8.81$). Quest'ultima si è dimostrata in grado di ridurre i fenomeni di schiacciamento rispetto all'utilizzo alle gabbie parto convenzionali. Infatti, le *performance* delle gabbie parto convenzionali sono state, sia numericamente che statisticamente le peggiori per il parametro considerato, quando confrontate con le gabbie tipo *balance* e tipo *slide cage* ($P=0.003$; $Chi-square=8.50$).

DISCUSSIONE

Nel nostro studio, i gruppi B e C hanno riportato un forte calo, sia numerico che percentuale, dei decessi derivanti dallo schiacciamento dei neonati nei tre giorni successivi al parto. L'analisi dei dati ottenuti dimostra che, a parità di condizioni manageriali, l'utilizzo di una gabbia innovativa (*slide cage/balance*) permette di ridurre l'incidenza della morte per schiacciamento (gruppo B e C). Infatti, il gruppo C, ha riportato un'incidenza dello 0.54% VS il 5.46% del gruppo con gabbie convenzionali. Negli anni, le perdite di suinetti, causate dallo schiacciamento, hanno evidenziato le necessità e, permesso, lo sviluppo di numerosi sistemi e strategie al fine di ridurre le perdite economiche derivanti dalla morte neonatale. Storicamente, già con il passaggio dall'utilizzo del box in cui la scrofa è libera di muoversi, alla ormai classica gabbia parto, ampiamente diffusa negli allevamenti, si è assistito ad una riduzione del numero di suinetti schiacciati all'interno di ciascuna nidata (Jarvis et al, 2005). Risulta perciò chiaro che la mortalità da schiacciamento può essere ridotta attraverso il miglioramento delle strutture aziendali; pur avendo la specie suina una mortalità periparto legata a caratteristiche fisiologiche ed etologiche sulle quali è difficile agire. È bene ricordare che l'utilizzo della gabbia parto può risultare stressante per la scrofa. Infatti, secondo Danholt et al. Il suo utilizzo sembra aumentare il tasso di natimortalità ed i fenomeni di aggressività nei confronti dei neonati (2011). Quindi, risulta fondamentale una progettazione oculata di strutture che vadano incontro sia alle esigenze della madre, che a quelle dei suinetti nei primi giorni dopo il parto. Questo approccio, come dimostrato in via preliminare dal nostro studio, porta invece ad un miglioramento delle *performances* delle scrofe e di conseguenza della produttività dell'allevamento stesso. Le gabbie non convenzionali utilizzate nel presente lavoro si sono rivelate altamente efficaci nel controllo dello schiacciamento dei suinetti sottoscrofa nel corso dei primi tre giorni di vita, considerati i più critici in termini di mortalità. Nel caso specifico, l'utilizzo di lampade riscaldanti poste al di sopra del "nido" associato alla gabbia parto tipo *slide cage*, fornisce protezione ai soggetti meno vitali che, scivolando all'interno del nido, hanno anche la possibilità di stabilizzarsi. In questo modo viene limitata la dispersione di calore corporeo ed i neonati risparmiano energia prima di essere posti a contatto con la madre. Studi recenti riportano che i suinetti più deboli nati da parti non assistiti possono trascorrere fino a 3h prima di compiere la prima poppata (Andersen et al, 2009). Durante questo lasso di tempo, la perdita di calore, con un conseguente rapido calo della temperatura corporea, associato ad un esaurimento delle energie per la competizione con gli altri suinetti può rivelarsi fatale (Andersen et al, 2008). Al momento del parto e nelle successive 24h, la madre trascorre la maggior parte del tempo in decubito laterale per permettere ai suinetti di assumere la maggior quantità di colostro e di latte materno. Progressivamente i cambi di posizione, responsabili degli schiacciamenti, divengono più frequenti, come parte integrante del processo graduale che porta allo svezzamento dei suinetti, rendendo difficoltoso l'attaccamento alla mammella e l'ottenimento del nutrimento. La creazione di una struttura in grado di rilevare in modo repentino il cambiamento di posizione della scrofa e che permette ai suinetti di stare a contatto con la madre solo quando quest'ultima si trova in decubito laterale o sternale, si è rivelata altamente efficace nel contenere il rischio di schiacciamenti, mostrando una riduzione numerica e percentuale rispetto alle gabbie parto convenzionali. Numerosi studi hanno dimostrato che la tendenza allo schiacciamento da parte della scrofa è correlata all'età dell'animale, all'ordine di parto e al tempo trascorso dall'inizio alla fine del parto (Jarvis et al, 2005). Ovviamente, i suinetti nati da parti languidi mostrano una minore vitalità alla nascita e la probabilità che vengano schiacciati aumenta in misura importante. Sebbene la maggior parte di gabbie parto sia dotata di aree dedicate, confortevoli e riscaldate con lampade ad infrarossi, i suinetti trascorrono i primi giorni di vita, ed in particolare le prime 24h dopo il parto (Danholt et al, 2011), a contatto con la scrofa attirati da stimoli tattili, termici e olfattori (Vasdal et al, 2010). Il comportamento dei suinetti, di fatto, li espone ad un rischio maggiore aumentando sensibilmente la probabilità di rimanere incastrati tra il peso della scrofa ed il pavimento o tra la scrofa e le sbarre della gabbia, andando incontro a morte. La

sopravvivenza dei suinetti nelle prime fasi di vita è quindi il risultato di complesse interazioni tra la scrofa, l'ambiente e la nidata.

In conclusione, le due tipologie di gabbie parto testate rappresentano un'innovazione rispetto alle gabbie parto comunemente utilizzate, hanno permesso di ridurre il tasso di mortalità da schiacciamento nei suinetti durante i primi tre giorni di vita, in particolare la tipologia *balance*. Pur non esistendo una soluzione in grado di eliminare completamente il problema, le strutture di moderna concezione (innovative) in sala parto offrono un risultato soddisfacente per i fabbisogni della scrofa, proteggendo allo stesso tempo i suinetti.

BIBLIOGRAFIA

Andersen I.L., Haukvik I.A., Bøe K.E. (2009) "Drying and warming immediately after birth may reduce piglet mortality in loose-housed sows". *Animal*. 3(4): 592-597.

Andersen I.L., Berg S., Bøe K.E. (2005) "Crushing of piglets by the mother sow (*Sus scrofa*) purely accidental or a poor mother?". *Appl Anim Behav Sci*. 93: 229-243.

Boyle L. A., Regan D., Leonard F.C., Lynch P. B., Brophy P. (2000) "The effects of mat on the welfare of sows and piglets in the farrowing house". *Anim Welfare*. 9: 39-48.

Cronin G. M., Lefébure B., McClintock S. (2000) "A comparison of piglet production and survival in the Werribee Farrowing Pen and conventional farrowing crates at a commercial farm". *Aust J Exp Agric*. 40: 17-23.

Damm B. I., Pedersen L. J. (2000) "Eliminative behaviour in preparturient gilts previously kept in pens or stalls". *Acta Agric Scand, Sect A*. 50: 316-320.

Danholt L., Moustsen V.A., Nielsen M.B.F., Kristensen A.R. (2011) "Rolling behaviour of sows in relation to piglet crushing on sloped versus level floor pens". *Livest Sci*. 141(1): 59-68.

Fangman T. S., Amass S. F. (2007) "Postpartum care of the sow and neonates" In: Youngquist R. S., Threlfall W. R. "Current therapy in large animal theriogenology". 2a ed., Saunders, St Louis, MI, 784-788.

Jarvis S., D'Eath R.B., Fujita K. (2005) "Consistency of piglet crushing by sows". *Anim Welfare*. 14: 43-51.

Kirkden R.D., Broom D.M., Andersen I.L. (2013) "Piglet mortality: Management solutions". *J Anim Sci*. 91(7): 3361-3389.

Marchant J.N., Rudd A.R., Mendl M.T., Broom D.M., Meredith M.J., Corning S., Simmins P.H. (2000) "Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems". *Vet Rec*. 147: 209-214.

Ostovic M., Pavicic Z., Tofant A., Kabalin A. E., Mencik S., Potocnjak D., Antunovic B. (2012) "Sow parity, body length, postural changes and piglet crushing". *Veterinarski Archiv* 82: 319-326.

Vasdal G., Glaerum M., Melisova M., Boe K.E., Broom D.M., Andersen I. L. (2010) "Increasing the pigs' use of the creep area-a battle against biology?". *Appl Anim Behav Sci*. 125: 96-102.

VALUTAZIONE DI DUE DIFFERENTI APPROCCI ANTIBIOTICI AL CONTROLLO DI MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO (SRD) IN SUINI IN SVEZZAMENTO

EVALUATION OF TWO DIFFERENT ANTIBIOTICAL APPROACHES FOR RESPIRATORY COMPLEX DISEASE (SRD) IN WEANERS

SCOLLO, A.^{1,2}, GOTTARDO, F.², MAZZONI, C.¹

¹ Medico Veterinario, Suivet snc; ²Università di Padova, dipartimento MAPS

Parole chiave: Suino, uso responsabile dell'antibiotico, svezzamento, trattamento individuale, trattamento di massa

Key words: Swine, responsible use of antibiotics, weaning, individual treatment, mass treatment

Riassunto

A causa del crescente fenomeno dell'antibiotico-resistenza e del conseguente impatto sul consumatore, si rende necessaria una nuova strategia di controllo delle patologie in suinicoltura attraverso un uso più responsabile degli antibatterici. Obiettivo dello studio è stato verificare l'efficacia di due approcci terapeutici diversi (trattamento di massa vs individuale iniettabile) per le principali patologie batteriche respiratorie. Lo studio ha coinvolto 650 lattoni: gruppo MASSA (n=323) trattato oralmente dopo l'accasamento con tilmicosina; gruppo INDIVIDUALE (n=318) trattato per via iniettabile con tulatromicina nei soggetti con sintomatologia clinica. L'approccio adottato nel gruppo INDIVIDUALE prevedeva la soglia del 20% di soggetti trattati all'interno del box come limite oltre il quale l'intero box doveva essere trattato per via iniettiva. Al raggiungimento di una seconda soglia pari al 15% di box trattati sul totale, sarebbe stata effettuata una medicazione di massa con tilmicosina. Il volume di prodotto antibiotico utilizzato è calato del 26,42% nel gruppo INDIVIDUALE (3719 vs 5054,6 gr, pari a 11,69 vs 15,64 gr/capo), con un risparmio economico di 100,68 euro totali (spesa di 0,15 vs 0,46 centesimi di euro/capo), senza alterare la mortalità (3,03%) né l'accrescimento (464 gr/gg/capo) dei due gruppi. Il gruppo INDIVIDUALE ha richiesto un maggior numero di interventi iniettabili per capo (0,29 vs 0,19; P=0,022), sottolineando l'importanza del personale tecnico in svezzamento, che ricopre un ruolo chiave nella scelta di un uso responsabile dell'antibiotico.

Abstract

Due to the emerging problem of antibiotic resistance and the consequent impact on the consumer, a new strategy of disease control in pig farming is needed through a more responsible use of antibacterial agents. Aim of the study was to verify the effectiveness of two different therapeutic approaches (mass treatment vs individual injectable) for the major bacterial respiratory diseases. The study involved 650 weaners: MASS group (n = 323) treated orally after arriving at the weaning site with tilmicosin; INDIVIDUAL group (n = 318) treated by injection with tulathromycin in subjects with clinical symptoms. The approach adopted in the INDIVIDUAL group included the threshold of 20% of subjects treated inside the box as the limit beyond which the entire box was treated by injection. On reaching a second threshold equal to 15% of treated box on the total, a mass medication with tilmicosin was administered. The volume of antibiotic product used has decreased by 26.42% in the INDIVIDUAL group (3719 vs 5054.6 gr, equal to 11.69 vs 15.64 gr/head), with a cost savings of EUR 100.68 in total (expense 0.15 vs 0.46 euro cents/head),

without affecting mortality (3.03%) or growing (464 gr/day/head) of the two groups. The INDIVIDUAL group received a greater number of injectable interventions per head (0.29 vs 0.19; $P = 0.022$), emphasizing the importance of the technical staff in weaning, which plays a key role in choosing a responsible use of antibiotic.

INTRODUZIONE

Le patologie respiratorie del suino hanno da sempre un impatto significativo sia sullo stato sanitario che produttivo dell'allevamento suinicolo che porta spesso ad un uso piuttosto estensivo degli antibiotici, specialmente per uso orale di massa ed in particolare nelle prime fasi di allevamento. L'utilizzo spesso poco razionale dell'antibiotico ha però portato negli ultimi anni al fenomeno dell'antibiotico-resistenza (WHO, 2011; Hollis e Ahmed, 2014), argomento critico sia dal punto di vista sanitario a causa della conseguente riduzione di efficacia delle molecole più utilizzate (Aarestrup, 2015; Ramirez et al., 2015), che dal punto di vista mediatico e del consumatore che diventa sembra più attento ed esigente quando si trova a dover scegliere sui banchi del supermercato il prodotto da consumare. Già da ora dunque e ancor più in prospettiva, si rende necessaria una nuova strategia di controllo delle patologie respiratorie attraverso un uso più responsabile e mirato degli antibatterici ed un miglioramento del management. Proprio in questa ottica si pone questo studio di campo che prevede l'indagine di un approccio più responsabile al trattamento farmacologico della malattia respiratoria del suino (SRD). Obiettivo dello studio è stato verificare l'efficacia di due approcci terapeutici diversi verso le principali patologie batteriche respiratorie: un trattamento di massa in metafilassi per via orale ed un trattamento individuale iniettabile in suini in fase di svezzamento.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un sito di svezzamento nel mantovano di circa 1900 posti, ed ha coinvolto un totale di 650 lattoni provenienti dalla stessa sala parto. La scelta è ricaduta su questa azienda per la sua routinaria adozione di un trattamento metafilattico di massa a sette giorni dall'accasamento per le sindromi respiratorie. Gli animali, che all'arrivo avevano quattro settimane di vita ed un peso medio di 7,2 kg, sono stati alloggiati a sessi misti in due diverse tipologie di box. I primi 231 lattoni sono stati collocati in un'unica sala con 12 gabbiette da 18-20 animali ciascuna (0,20 m²/capo), mentre i restanti 419 in una seconda sala con quattro box da 103-105 animali ciascuno (0,20 m²/capo). Entrambe le soluzioni avevano pavimento in grigliato (in metallo nelle gabbiette, in plastica nei box), alimentazione sfarinata a secco ed acqua *ad libitum*, e ventilazione forzata. All'accasamento, è stato somministrato mangime medicato con amoxicillina triidrato 115 mg/g (pari ad amoxicillina base 100 mg/g) e colistina solfato (20.000 U.I./mg) 40 mg/g, per un totale di 600 gr al quintale di mangime per cinque giorni a tutti gli animali. Ventidue giorni dopo l'accasamento, gli animali di ciascuna gabbietta/box sono stati divisi in due per taglia, spostando gli animali più grossi in una gabbietta/box identica a quella di origine per continuare a garantire un corretto spazio/capo ed un buon pareggiamento senza mescolare gli animali (0,40 m²/capo; 24 gabbiette in totale da 9-10 animali ciascuna; otto box in totale da 50-53 animali ciascuno).

Sia nella sala con le gabbiette che in quella con i box, gli animali a destra del corridoio sono stati destinati al gruppo di trattamento terapeutico individuale (gruppo INDIVIDUALE, $n = 318$), mentre quelli a sinistra al gruppo di trattamento metafilattico di massa (gruppo MASSA, $n = 323$). Sette giorni dopo l'accasamento (T0) è stato somministrato al gruppo MASSA un trattamento in acqua di abbeverata con tilmicosina per la durata di sette giorni. Il gruppo INDIVIDUALE ha invece ricevuto iniezioni intramuscolari con tulatromicina in un'unica somministrazione limitatamente agli animali che presentavano sintomatologia

clinica respiratoria. L'approccio adottato nel gruppo INDIVIDUALE prevedeva la soglia del 20% di soggetti trattati all'interno della gabbietta/box come limite oltre il quale l'intera gabbietta/box doveva essere trattata con il medesimo farmaco per via intramuscolare, per ridurre il rischio di contagio degli animali a contatto in caso di elevata pressione infettante. Al raggiungimento di una seconda soglia pari al 15% di animali trattati sul totale, sarebbe stata effettuata una medicazione di massa con tilmicosina. Tutti gli animali del gruppo INDIVIDUALE trattati per via intramuscolare sono stati identificati tramite apposita marca auricolare numerata con numero progressivo per valutare l'andamento clinico del soggetto. Tutte le gabbiette/box di entrambi i gruppi di trattamento sono state singolarmente monitorate tramite apposita scheda di valutazione, annotando giornalmente il numero di animali trattati, la sintomatologia clinica, l'eventuale necessità di ritrattamento dello stesso animale e la mortalità. I soggetti con una clinica grave sono stati separati dal gruppo ed esclusi dalla prova per essere collocati in un apposito locale infermeria. Mentre per le sindromi respiratorie si è utilizzata la tulatromicina come farmaco iniettabile e la tilmicosina come farmaco per os (selezionati perché entrambi del gruppo dei macrolidi), per quelle non respiratorie si è scelto il farmaco di elezione a seconda della patologia. Per valutare eventuali differenze di accrescimento, gli animali alloggiati nelle gabbiette sono stati pesati per ciascuna gabbietta al settimo giorno post-accasamento (T0), al momento della divisione per il pareggiamento (T22) ed alla fine della prova 42 giorni dopo l'accasamento (T42).

Per la valutazione statistica dei risultati è stato effettuato un t-test di student per il confronto tra medie, ed il test del chi-quadro con correzione di Yates per il confronto tra frequenze.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il peso medio dei suinetti al T0 era di 9,8 kg, con nessuna differenza statistica tra gruppi di trattamento. L'assenza di differenze statistiche per quanto riguarda i pesi degli animali si è mantenuta durante l'intero periodo di osservazione, con un peso medio di 18,9 kg a T22 (IMG T0/T22 = 414 gr/capo; $P > 0,05$) e di 29,3 kg a T42 (IMG T22/T42 = 519 gr/capo; $P > 0,05$). Nemmeno l'IMG dell'intero periodo ha evidenziato differenze significative (IMG T0/T42 = 464 gr/capo; $P > 0,05$), così come la mortalità (T0/T22 = 2,16%; T22/T42 = 0,90%; T0/T42 = 3,03%). Dopo la conclusione del periodo di osservazione, gli animali sono rimasti in svezzamento altri 21 giorni, raggiungendo nell'intero periodo una mortalità totale di 3,14% ed un peso medio di 37,2 kg.

Durante la prova si è verificata una problematica di steptococchi clinica con inizio 13 giorni dopo l'inizio della prova (T13). Quattro animali sono stati esclusi dalla prova (3 spostati nel locale infermeria, 1 morto; 3 appartenenti al gruppo MASSA, 1 al gruppo INDIVIDUALE). Visto l'aumentare dei casi clinici nei giorni seguenti, si è scelto di trattare con amoxicillina in acqua da bere (2 gr/q.le di peso vivo) tutti gli animali senza distinzione di gruppo.

I trattamenti antibiotici utilizzati durante il periodo di osservazione sono indicati nella Tabella 1. Nel complesso, il volume di prodotto antibiotico utilizzato è calato del 26,42% nel gruppo INDIVIDUALE (3719 vs 5054,6 gr, pari a 11,69 vs 15,64 gr per capo), con un risparmio economico di 100,68 euro totali (spesa di 0,15 vs 0,46 centesimi di euro per capo). Il risultato sembra dunque aver portato ad un duplice effetto positivo dell'applicazione del protocollo INDIVIDUALE: da un lato la riduzione dei costi per l'allevatore, e dall'altro la riduzione dell'utilizzo dell'antibiotico con una conseguente importanza di immagine che ha sempre più un enorme peso sui criteri di scelta del consumatore. C'è infatti da considerare che, negli ultimi anni, una percentuale sempre crescente di filiere di consumatori richiede un prodotto che ritiene tanto più di qualità quanto meno utilizza antibiotici durante la crescita degli animali dai quali deriva (Rojo-Gimeno et al., 2016).

Per questo, l'allevamento biologico ed antibiotic-free sta prendendo piede ritagliandosi prepotentemente una fetta di mercato. Il protocollo proposto nel presente studio può essere utile non solo nell'allevamento intensivo convenzionale, ma anche nelle realtà in cui ci si appropria ai nuovi disciplinari biologico ed antibiotic-free, per i quali può anche rendersi necessaria una personalizzazione delle due soglie proposte (>20% degli animali con sintomatologia per agire con iniezione individuale su tutto il box; >15% dei box interamente trattati per via iniettabile per somministrare un trattamento per via orale) in base alle capacità di individuazione precoce della sintomatologia degli animali da parte dei tecnici in allevamento. Il ruolo del tecnico emerge infatti come di primaria importanza nell'applicazione del protocollo INDIVIDUALE. In totale, come era ragionevole aspettarsi visto il mancato trattamento di massa, il gruppo INDIVIDUALE ha richiesto un maggior numero di interventi iniettabili per capo (0,29 vs 0,19; P = 0,022). Questo sottolinea come sia indispensabile considerare che ridurre l'uso dell'antibiotico vuol dire anche dare una maggiore responsabilità al personale addetto ai trattamenti, che conseguentemente deve essere formato al riconoscimento precoce dei sintomi e deve essere pro-attivo nella tempestiva cura degli animali malati. Per questo motivo, è d'obbligo sottolineare come il protocollo non sia applicabile in qualsiasi realtà zootecnica, bensì solo nelle aziende dove il personale tecnico è già sufficientemente formato e pronto per gestire che situazione che richiede un'attenzione molto più alta rispetto alle tecniche di trattamento più convenzionali. Diversamente, la formazione del personale e la sua valorizzazione possono essere la strada giusta per avvicinare gradualmente ad un approccio più responsabile all'antibiotico anche le aziende concettualmente più lontane.

Spesa trattamenti antibiotici/capo	Massa (n = 323)		Individuale (n = 318)		Differenza euro
	gr*	euro	gr*	euro	
Per os					
Amoxicillina + Colistina	3500	26,25	3500	26,25	0
Tilmicosina	1356,6	107,2	0	0	-107,2
Amoxicillina	128	3,88	128	3,88	0
Iniettabili					
Tulatromicina	14	6,11	30	13,09	6,98
Amoxicillina	8	0,54	32	2,14	1,6
Amoxicillina + ac. clavulanico	0	0	3	0,61	0,61
Enrofloxacin	48	5,84	26	3,17	-2,67
Totali	5054,6	149,82	3719	49,14	-100,68

Tabella 1. Spesa relativa all'utilizzo di antibiotici in ciascun gruppo di trattamento.

*di prodotto

Table 1. Costs related to the use of antibiotics in each treatment group.

* of product

BIBLIOGRAFIA

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. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370(1670), 20140085.

Hollis, A., & Ahmed, Z. (2014). The path of least resistance: Paying for antibiotics in non-human uses. *Health policy*, 118(2), 264-270.

Ramirez, C. R., Harding, A. L., Forteguerra, E. B. R., Aldridge, B. M., & Lowe, J. F. (2015). Limited efficacy of antimicrobial metaphylaxis in finishing pigs: A randomized clinical trial. *Preventive veterinary medicine*, 121(1), 176-178.

Rojo-Gimeno, C., Postma, M., Dewulf, J., Hogeveen, H., Lauwers, L., & Wauters, E. (2016). Farm-economic analysis of reducing antimicrobial use whilst adopting improved management strategies on farrow-to-finish pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 129, 74-87.

World Health Organization. (2011). Critically important antimicrobials for human medicine.

**LA CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI CEPPI
MULTI-RESISTENTI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE*
RIVELA LA PRESENZA DI UN NUOVO GENE RESPONSABILE
DI RESISTENZA VERSO I LINCOSAMIDI**

***MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MULTI-DRUG
RESISTANT STRAINS OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE
REVEALS THE PRESENCE OF A NEW LINCOSAMIDES-
RELATED RESISTANCE GENE***

DE LUCAS¹, CUCCO L.¹, MASSACCI F.R.¹, MAGISTRALI C.F.¹, PERRETEN V.²

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

² Institute of Veterinary Bacteriology, University of Bern, Switzerland

Parole chiave: antibiotico-resistenza, trasposone, mutazioni puntiformi

Key words: drug-resistance, transposon, single point mutations

Riassunto: L'utilizzo appropriato di antibiotici per la terapia della Dissenteria suina, malattia sostenuta dal batterio *Brachyspira hyodysenteriae*, è essenziale al fine di ridurre l'impatto della malattia negli allevamenti suini. Recentemente, sono stati registrati in tutta Europa fenomeni di resistenza da parte di *B. hyodysenteriae* nei confronti dei principali antimicrobici utilizzati per lo scopo, associati a mutazioni puntiformi a carico della proteina ribosomiale L3 o del 23S rRNA. Scopo di questo studio, è stato quello di caratterizzare dal punto di vista molecolare, ceppi di *B. hyodysenteriae* multi-resistenti isolati in Italia; in particolare, grazie ad un approccio con tecniche di sequenziamento di nuova generazione, è stato individuato per la prima volta in un ceppo di *B. hyodysenteriae* un gene (*lnu* tipo C) legato alla resistenza nei confronti dei lincosamidi e precedentemente descritto in *Streptococcus agalactiae* e in *Haemophilus parasuis*. Tale gene era localizzato su un elemento mobile (trasposone) ed è stato fortemente associato ad un Sequence Type (ST83), già precedentemente descritto come di recente distribuzione in Italia. Inoltre, i ceppi indicati presentavano una mutazione a carico della sequenza del 23S rRNA, descritta da altri autori come possibile fattore determinante resistenza crociata e aspecifica nei confronti di lincosamidi, pleuromutiline e macrolidi, indicando una possibile azione sinergica di più fattori che determinano multi-resistenza. I risultati indicano una possibile recente acquisizione di un determinante genetico da parte di ceppi multi-resistenti di *B. hyodysenteriae*, suggerendo come le tecniche di sequenziamento di nuova generazione essenziali per la determinazione di nuovi fattori genetici.

Abstract: The proper use of antibiotics for the therapy of Swine Dysentery, a disease caused by the bacterium *Brachyspira hyodysenteriae*, is crucial to reduce the impact of this disease in the pig industry. Recently, antibiotic-resistance phenomena of *B. hyodysenteriae* have been registered throughout Europe towards the antimicrobials mostly used for this purpose, associated to single point mutations on ribosomal protein L3 or 23S rRNA. The aim of this study was to characterize at molecular level multi-drug resistant strains *B. hyodysenteriae* isolated in Italy; in particular, new generation sequence techniques allowed to identify for the first time a novel gene (*lnu* type C) in a strain of *B. hyodysenteriae*, related to resistance to lincosamides and previously described in *Streptococcus agalactiae* and in *Haemophilus parasuis*. The gene was located on a mobile element (transposon) and was strongly associated to a Sequence Type (ST83), already described as recently spread in Italy. Furthermore, these strains presented a single-point mutation on 23S rRNA, reported by other authors as

a possible cause of cross-resistance against lincosamides, pleuromutilins and macrolides, indicating a possible synergic effect of multiple factors that can determine multi-resistance. Results demonstrates a possible recent acquisition of a genetic determinant by multi-resistant strains of *B. hyodysenteriae*, showing that the new generation sequence techniques are crucial for the determination of novel genetic determinants.

INTRODUZIONE

Brachyspira hyodysenteriae è l'agente eziologico della Dissenteria Suina, una malattia enterica caratterizzata da colite muco-emorragica e diarrea da moderata a grave, con conseguente riduzione di peso, ridotto accrescimento e mortalità nei casi gravi (Alvarez-Ordóez et al., 2013; Burrough, 2016). Il trattamento mirato con antibiotici, insieme all'utilizzo di appropriate misure di biosicurezza, è cruciale per la riduzione dell'impatto di tale patologia negli allevamenti suini (Hillen et al. 2014; Hampson et al., 2015). Gli antibiotici maggiormente utilizzati per questo scopo sono macrolidi, lincosamidi e pleuromutiline (Hillen et al., 2014). Negli ultimi anni, è stato registrato in Europa una riduzione nella sensibilità agli antimicrobici sopra descritti (Rohde et al., 2004; Hidalgo et al., 2011; Rugna et al., 2015). L'insorgenza di antibiotico-resistenza è stata legata alla presenza di mutazioni puntiformi (single nucleotide polymorphisms o SNPs) a carico del 23S rRNA o della proteina ribosomiale L3, le quali possono determinare alterazioni conformazionali che modificano il legame degli antibiotici con le subunità ribosomiali, dove normalmente agiscono inibendo la sintesi proteica (Pringle et al., 2004; Hidalgo et al., 2011;). Ad esclusione di quelle sopra descritte, non sono state riportate altri determinati genetici di antibiotico-resistenza di *Brachyspira hyodysenteriae*.

Scopo del seguente lavoro è stato quello di caratterizzare da un punto di vista molecolare ceppi multi-resistenti di *B. hyodysenteriae* isolati in Italia. In particolare, tramite tecniche di sequenziamento di nuova generazione (NGS), sono stati indagati i determinanti genetici di antibiotico-resistenza in un ceppo multiresistente di *B. hyodysenteriae*; successivamente, la presenza di tali determinanti genetici è stata investigata in una collezione di ceppi di *B. hyodysenteriae* sottoposti a test di sensibilità nei confronti di sei antibiotici comunemente utilizzati in allevamento per la terapia della Dissenteria Suina.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici e test di sensibilità

Undici (n=11) isolati di *B. hyodysenteriae*, provenienti da una collezione di ceppi dell'Istituto Zooprofilattico dell'Umbria e delle Marche, sono stati sottoposti ad analisi. Tutti i ceppi sono stati precedentemente identificati con certezza come *B. hyodysenteriae* tramite restriction fragment length polymorphism del gene *nox* (Rohde et al., 2002). Inoltre, è stata valutata la sensibilità nei confronti di sei antibiotici (tilosina, tiamulina, valnemulina, lincomicina, tilvalosina e doxiciclina), secondo quanto previsto dal pannello VetMIC Brachy (SVA, Sweden). Nella tabella 1 sono descritte le informazioni relative ai ceppi utilizzati in questo studio.

Tra quelli disponibili, un ceppo (BH_718) è stato scelto per essere sottoposto ad analisi tramite Next Generation Sequencing (NGS). Tale ceppo proveniva da un allevamento del centro Italia endemicamente infetto da Dissenteria suina e presentava un profilo di multiresistenza, in particolare presentava un livello di MIC molto elevato nei confronti di tiamulina, tilosina e lincomicina.

Whole Genome Sequencing (WGS)

Il ceppo BH_718 è stato sottoposto a sequenziamento di nuova generazione (NGS) presso il Genome Technology Facility dell'Università di Losanna (Svizzera). Il DNA è stato sequenziato tramite tecnologia Pacific Bioscience R.S. (70'000 reads/3000 bp average read length) e Illumina HiSeq (9'000'000 reads/300 average read length). La qualità dei risultati

ottenuti è stata valutata tramite piattaforma FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e assemblati tramite piattaforma Vital-IT (<http://www.vital-it.ch>), usando il modulo di assemblaggio 'ALLORA'. Sono stati ottenute due unità genomiche rappresentate dal genoma completo di *B. hyodysenteriae* ceppo 718 costituito da 3,086,550-bp di cui 3,018,636-bp del cromosoma batterico, con un contenuto G+C del 27.10%, e di un plasmide di 67,914-bp, con un contenuto G+C pari al 22.40%. Il genoma è stato annotato usando il software Prokka e sono state identificate un totale di 2,726 geni codificanti-proteine e 38 geni-RNA. La sequenza genomica è stata infine sottomessa all'analisi tramite software ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) al fine di identificare la presenza di eventuali geni coinvolti nel fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

Estrazione del DNA, condizioni di PCR e sequenziamento.

Tutti i ceppi sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico tramite il kit DNeasy blood & tissue (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni della casa produttrice. Il DNA è stato quindi conservato a -20 °C in attesa di essere sottoposto a successive analisi. Tutti i primers utilizzati per le prove di PCR, le temperature di annealing e i tempi sono descritti nella tabella 2.

Una iniziale PCR è stata effettuata per valutare la presenza del gene *lnu(C)* utilizzando i primers int_lnuC forward e reverse (tabella 2); successivamente, i ceppi positivi sono stati sottoposti ad una seconda PCR al fine di amplificare l'intero elemento mobile MtnLNU utilizzando i primers TN-lnu forward e reverse (tabella 2). I prodotti di PCR sono stati sequenziati come descritto successivamente. I primers per la PCR e il sequenziamento del gene *lnu(C)* e dell'elemento mobile MtnLNU sono stati designati con il software Genious 10.0.5 (Kearse et al., 2012) with a focus on molecular sequences and related data types. It integrates numerous industry-standard discovery analysis tools, with interactive visualizations to generate publication-ready images. One key contribution to researchers in the life sciences is the Geneious public application programming interface (API).

Parte della subunità ribosomiale 50S, nello specifico il dominio V del 23S rRNA e il gene codificante per la proteina ribosomiale L3, sono stati amplificati e sequenziati come descritto da altri autori. (Hillen et al., 2014; Karlsson et al., 1999; Pringle et al., 2004). Per tutte le indagini in PCR, 2 µl di DNA sono stati aggiunti a 28 µl di una mix per PCR costituita in modo da avere una concentrazione finale di 1.5 mM MgCl₂, PCR buffer B, 0.2 mM desossinucleotidi trifosfati, 2.5 U DNA Polimerasi (FIREPol ® DNA Polymerase, Solis BioDyne), 0.5 µM primer Forward e 0.5 µM primer Reverse.

Il DNA è stato amplificato alle seguenti condizioni: 95 °C per 15 minuti di attivazione della DNA polimerasi, 35 cicli di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, annealing come descritto in tabella 2 e estensione a 72°C per due minuti, seguiti da una estensione finale a 72°C per 10 minuti.

I prodotti di PCR sono stati direttamente sequenziati usando una reazione 10 µl totale composta da 1 µl di (5X) BigDye (Applied Biosystems, California, US), 2 µl di (10X) Buffer sequencing (Applied Biosystems, California, US), 3 µl di prodotti di PCR e Ultrapure water. Come sequenziatore è stato utilizzato il 3130 xl Genetic Analyzer con un Sistema a 16 capillari (Applied Biosystems, California, US).

Le sequenze ottenute sono state analizzate e corrette con il software Genious 10.0.5; in particolare, le sequenze parziali del 23S rRNA e del gene L3 sono state allineate e numerate in base alla numerazione dell'*Escherichia coli* (CP001357) e *B. hyodysenteriae* (C0QVZ) rispettivamente, mentre la regione MtnLNU è stata allineata alla sequenza di *Streptococcus agalactiae* UCN36 (AY928180).

Multi Locus Sequence Typing

I ceppi sono stati tipizzati tramite metodica MLST al fine di valutare la clonalità dei ceppi seguendo il protocollo descritto da Rasback e collaboratori (Rasback et al.

2007)”plainCitation”:(Rasback et al. 2007 Le sequenze dei setti geni *housekeeping* sono stati analizzati e, se necessario, manualmente corretti grazie al software Sequencer 5.4.6 (Sequencher® version 5.4.6 DNA sequence analysis software, Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI USA). A ciascun isolato è stato assegnato un ST in base al suo profilo allelico confrontando i profili con quelli disponibili sul database dei profili MLST di *B.hyodysenteriae* (<http://pubmlst.org>)

Tabella 1: Lista degli isolati analizzati in questo studio con Sequence Type, valori di MIC per tilosina, lincomicina, tiamulina, valnemulina, doxiciclina e tilvalosina, SNPs a carico del 23S rRNA e risultati della PCR per la detenzione del gene *lnu(C)*.

Table 1: List of isolates with Sequence Type, MICs for tylosin, lincomycin, tiamulin, valnemulin, doxycycline, tylvalosin, SNPs found on 23S rRNA and results of PCR for the detection of the *lnu(C)* gene.

Sample #	ST	TIL	LIN	TIA	VAL	DOXI	TILV	A2058	C2146	<i>lnu(C)</i>
B495	79	>128	8	0,5	0,5	0,5	1	T	C	Negativo
B516	83	>128	64	0,5	0,25	1	4	T	T	Positivo
B534	83	>128	64	8	4	0,5	8	T	T	Positivo
B538	83	>128	64	0,25	0,125	0,5	2	T	T	Positivo
B541	83	>128	64	>8	1	1	4	T	T	Positivo
B635	83	>128	64	8	1	1	2	T	T	Positivo
B674	83	>128	64	4	4	0,25	1	T	T	Positivo
B697	83	>128	>64	>8	2	1	4	T	T	Positivo
B699	83	>128	64	8	2	1	4	T	T	Positivo
B718	83	>128	64	8	4	8	8	T	T	Positivo

Tabella 2: Lista di primers utilizzati in questo studio

Table 2: List of primers used in this study

Primers	Target (dimensioni in bp)	Sequenza (5'-3')	Temp. ann.	Riferimento bibliografico
23SF 23SR	23S rRNA (910)	F: GAGAGGTTAGCGTAAGCGAAGC R: GCTTCCCACTTAGATGCTTTCAG	52 °C	Hillen et al. 2014
L3F L3R	Ribosomal protein L3 (750)	F: TATAGAGGATTCGCCGATGGTAG R: TCTCTAAATTGCCTACGCTATCTC	52 °C	Hillen et al. 2014
<i>lnu(C)_intR</i> <i>lnu(C)_intR</i>	<i>lnu(C)</i> gene (495)	F: TTTCTTGATGGTGGCTGGGG R: TCAAACCTCGTATCCCAGATGG	54 °C	This study
<i>lnu(C)_TN-F</i> <i>lnu(C)_TN-R</i>	Mobile element (1724)	F:AATTTTGCCATATATCCGTAATGCT R:GCTTGCAAGCGGTGATAATAA	56 °C	This study

RISULTATI

L’analisi del genoma tramite software ResFinder ha permesso di identificare per la prima volta in *B.hyodysenteriae* la presenza del gene *lnu* (lincosamides nucleoditylation) tipo C. Il gene era localizzato su un elemento mobile insieme ad un gene codificante per l’enzima transposasi facente parte della classe delle transposasi IS1. Tale elemento mobile, chiamato Mtn*LNU*, era delimitato da due regioni di 25 basi invertite, tipiche dei transposoni, i due geni erano localizzati in posizione 996181-997900 del ceppo BH_718, per una lunghezza totale di 1.724 basi. L’elemento mobile è stato trovato essere molto simile (99%) a quelli già

descritti da altri autori in *Streptococcus agalactiae* UCN36 e *Haemophilus parasuis* HN7061 (Figura 1). La PCR effettuata al fine di identificare il gene *lnu(C)*, ha permesso di evidenziare la presenza di questo in 9 ceppi su 10 e tutti loro presentavano lo stesso elemento mobile integrato nel genoma. L’analisi a carico del 23S rRNA ha permesso di evidenziare la presenza di due mutazioni puntiformi in posizione 2058 e 2146 (*E.coli* numbering) negli stessi ceppi presentanti il gene *lnu(C)*, il ceppo restante presentava solo la mutazione in posizione 2058. Nessuna mutazione a carico di L3. La MLST ha permesso di evidenziare la clonalità dei ceppi sottoposti ad analisi, i quali, ad esclusione di uno, appartenevano al Sequence Type 83.

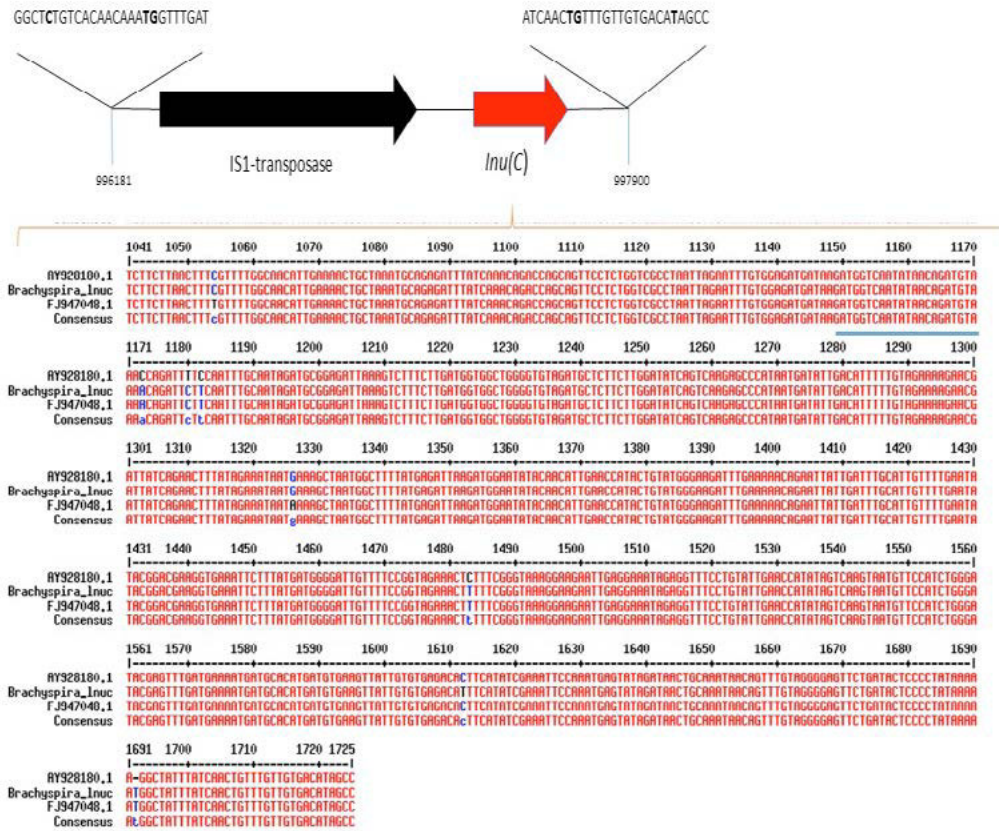


Figura 1: Mappa schematica dell’elemento mobile rinvenuto nel ceppo di *B.hyodysenteriae* (BH_718) sottoposto a *Whole Genome Sequencing*. L’elemento contiene un gene codificante per l’enzima *transposase* (tipo IS1) e il gene *lnu(C)*. L’allineamento tra le sequenze del gene *lnu(C)* di BH_718, *S.agalactiae* (AY8180.1) e *H.parasuis* (FJ947048.1), mette in evidenza l’alta omologia tra le sequenze.

Figure 1: Schematic map of mobile element found on *B.hyodysenteriae* (BH_718) submitted to *Whole Genome Sequencing*. The element contain a gene encoding for a *transposase* (type IS1) and the *lnu(C)* gene. The alignment of the three sequences of the *lnu(C)* gene of BH_718, *S.agalactiae* (AY8180.1) e *H.parasuis* (FJ947048.1), enhance the high similarity between them.

DISCUSSIONE

In questo studio, è stata dimostrata per la prima volta la presenza di un gene responsabile di resistenza nei confronti dei lincosamidi in *Brachyspira hyodysenteriae*. Tale gene, definito *lnu(C)* è stato già descritto in *Streptococcus agalactiae* UCN36 (Achard et al. 2005) e in *Haemophilus parasuis* (Chen et al. 2010). Il gene è inserito all'interno di una regione transposonica, definita *MtnLNU*, che, essendo un elemento genetico mobile, potrebbe essere trasferito tra batteri di famiglie e generi diversi. Il gene *lnu(C)* appartiene ad una classe di geni responsabili della sintesi di enzimi che vanno a inattivare in maniera specifica i lincosamidi tramite reazioni di nucleotidilazione e fosforilazione del gruppo ossidrilico in posizione 3 (Achard et al. 2005). Sono stati descritti diverse forme di tale gene, ad esempio *lnu(A)*, *lnu(B)* e *lnu(F)* in *Staphylococcus haemolyticus*, *Enterococcus faecium* e *Escherichia coli*, rispettivamente (Brisson-Noël and Courvalin 1986; Bozdogan et al. 1999; Heir et al. 2004). In *B. hyodysenteriae*, una resistenza crociata e aspecifica nei confronti dei macrolidi e della lincomicina è stata descritta come esito di mutazioni puntiformi a carico del 23S rRNA; in particolare, la sostituzione di un nucleotide (A→T) in posizione A2058 (*E. coli* numbering) è stata indicata essere responsabile di modificare la struttura del centro dell'enzima peptidil-trasferasi (PTC), a livello del quale agiscono gli antibiotici sopra citati. Tale mutazione è stata riscontrata da diversi autori, tuttavia, in uno studio di Hidalgo e collaboratori (2011), alcuni ceppi di *B. hyodysenteriae* presentavano la mutazione A2058T ma erano suscettibili nei confronti della lincomicina. Nel nostro studio, tutti i ceppi che albergavano il gene *lnu(C)* presentavano la mutazione A2058 ed erano resistenti sia nei confronti della tilosina che della lincomicina, tuttavia, l'unico ceppo non presentante il gene, presentava una MIC molto più bassa rispetto ai ceppi *lnu(C)*-positivi, indicando un effetto da parte del gene sulla sensibilità del ceppo batterico. Interessante notare come tutti i ceppi *lnu(C)*-positivi appartenevano al ST83; questo ST è stato descritto per la prima volta da Rugna e collaboratori nel 2015 (Rugna et al. 2015) e descritto come ceppo multiresistente e di recente distribuzione in Italia. Questo evidenzia la possibilità di persistenza negli allevamenti suini italiani di ceppi con una scarsa sensibilità nei confronti di diverse classi di antibiotici dovuta all'acquisizione di determinanti genetici anche trasferiti da altre specie batteriche.

CONCLUSIONI

In questo lavoro è stata dimostrata per la prima volta la presenza di un nuovo gene collegato alla resistenza nei confronti della lincomicina e fortemente connesso ad uno specifico ceppo clonale. Ulteriori studi sono richiesti per verificare l'effettiva distribuzione del gene sopra descritto nella popolazione batterica e l'effetto che tale gene potrebbe avere su altri antibiotici facenti parte della classe dei lincosamidi. In ultima analisi le tecniche di sequenziamento di nuova generazione si sono rivelate essere indispensabili per l'acquisizione di nuove conoscenze nell'ambito dell'antibiotico resistenza.

BIBLIOGRAFIA

- Achard, A., C. Villers, V. Pichereau, and R. Leclercq. 2005. "New *lnu(C)* Gene Confering Resistance to Lincomycin by Nucleotidylation in *Streptococcus Agalactiae* UCN36." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49 (7): 2716–19..
- Alvarez-Ordóez, Avelino, Francisco Martínez-Lobo, Héctor Arguello, Ana Carvajal, and Pedro Rubio. 2013. "Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and the Fight against the Disease." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10 (5): 1927–47..
- Bozdogan, Bülent, Latifa Berrezouga, Ming-Shang Kuo, David A. Yurek, Kathleen A. Farley, Brian J. Stockman, and Roland Leclercq. 1999. "A New Resistance Gene, *linB*, Confering Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus Faecium* HM1025." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43 (4): 925–929.

- Brisson-Noël, A., and P. Courvalin. 1986. "Nucleotide Sequence of Gene *linA* Encoding Resistance to Lincosamides in *Staphylococcus Haemolyticus*." *Gene* 43 (3): 247–53.
- Burrough, E. R. 2016. "Swine Dysentery: Etiopathogenesis and Diagnosis of a Reemerging Disease." *Veterinary Pathology*, June..
- Chen, L.-P., X.-W. Cai, X.-R. Wang, X.-L. Zhou, D.-F. Wu, X.-J. Xu, and H.-C. Chen. 2010. "Characterization of Plasmid-Mediated Lincosamide Resistance in a Field Isolate of *Haemophilus Parasuis*." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 65 (10): 2256–58.
- Hampson, David J., Tom La, and Nyree D. Phillips. 2015. "Emergence of *Brachyspira* Species and Strains: Reinforcing the Need for Surveillance." *Porcine Health Management* 1 (1).
- Heir, Even, Bjørn-Arne Lindstedt, Truls M. Leegaard, Elisabet Gjernes, and Georg Kapperud. 2004. "Prevalence and Characterization of Integrins in Blood Culture Enterobacteriaceae and Gastrointestinal *Escherichia Coli* in Norway and Reporting of a Novel Class 1 Integron-Located Lincosamide Resistance Gene." *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 3 (1): 1.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, B. Vester, M. Pringle, G. Naharro, and P. Rubio. 2011. "Trends towards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistance among Clinical Isolates of *Brachyspira Hyodysenteriae* in Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (7): 3330–37..
- Hillen, Sonja, Hermann Willems, Werner Herbst, Judith Rohde, and Gerald Reiner. 2014. "Mutations in the 50S Ribosomal Subunit of *Brachyspira Hyodysenteriae* Associated with Altered Minimum Inhibitory Concentrations of Pleuromutilins." *Veterinary Microbiology* 172 (1–2): 223–29..
- Karlsson, Märit, Claes Fellström, Malin UK Heldtander, Karl-Erik Johansson, and Anders Franklin. 1999. "Genetic Basis of Macrolide and Lincosamide Resistance in *Brachyspira* (Serpulina) *Hyodysenteriae*." *FEMS Microbiology Letters* 172 (2): 255–260.
- Kearse, Matthew, Richard Moir, Amy Wilson, Steven Stones-Havas, Matthew Cheung, Shane Sturrock, Simon Buxton, et al. 2012. "Geneious Basic: An Integrated and Extendable Desktop Software Platform for the Organization and Analysis of Sequence Data." *Bioinformatics* 28 (12): 1647–49.
- Pringle, Märit, Jacob Poehlsgaard, Birte Vester, and Katherine S. Long. 2004. "Mutations in Ribosomal Protein L3 and 23S Ribosomal RNA at the Peptidyl Transferase Centre Are Associated with Reduced Susceptibility to Tiamulin in *Brachyspira* Spp. Isolates: Tiamulin Resistance in *Brachyspira* Spp. Isolates." *Molecular Microbiology* 54 (5): 1295–1306.
- Rasback, T., K.-E. Johansson, D. S. Jansson, C. Fellstrom, M. Y. Alikhani, T. La, D. S. Dunn, and D. J. Hampson. 2007. "Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Intestinal *Spirochaetes* within the Genus *Brachyspira*." *Microbiology* 153 (12): 4074–87.
- Rohde, J. 2004. "Comparison of Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing and MIC Values for Pleuromutilin Drugs for *Brachyspira Hyodysenteriae* Isolated in Germany." *Veterinary Microbiology* 102 (1–2): 25–32.
- Rohde, J., A. Rothkamp, and G. F. Gerlach. 2002. "Differentiation of Porcine *Brachyspira* Species by a Novel Nox PCR-Based Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis." *Journal of Clinical Microbiology* 40 (7): 2598–2600.
- Rugna, G., P. Bonilauri, E. Carra, F. Bergamini, A. Luppi, Y. Gherpelli, C.F. Magistrali, et al. 2015. "Sequence Types and Pleuromutilin Susceptibility of *Brachyspira Hyodysenteriae* Isolates from Italian Pigs with Swine Dysentery: 2003–2012." *The Veterinary Journal* 203 (1): 115–19.

**RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *E. COLI* ISOLATI IN
ALLEVAMENTI DI SUINI A CICLO CHIUSO: INTERFACCIA
ANIMALI-UOMO-AMBIENTE**

ANTIMICROBIALS RESISTANCE IN *E. COLI* FROM FARROW-TO-FINISH PIG FARMS: THE ANIMALS-HUMAN -ENVIRONMENT INTERFACE

CIBIN V.¹, DRIGO M.², TIENGO A.¹, ANTONELLO K.¹, MANCIN M.¹,
LOSASSO C.¹, RICCI A.¹

¹Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;

²Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi di Padova;

Parole chiave: antimicrobico resistenza, allevamenti suini, *E. coli*

Key words: antimicrobial resistance, pig farms, *E. coli*

RIASSUNTO

L'utilizzo degli antimicrobici, anche negli animali allevati a scopo zootecnico, è la principale causa dell'insorgenza dell'antibiotico resistenza, i cui rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente sono ampiamente riconosciuti a livello mondiale.

Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici (AR) attraverso la determinazione del profilo di resistenza in batteri indicatori, quali *E. coli*, rappresenta un utile strumento per valutare lo *status* del fenomeno.

Al fine di approfondire le conoscenze sulle modalità di diffusione della AR in nicchie ecologiche correlate all'allevamento del suino, sono stati sottoposti a monitoraggio intensivo due allevamenti a ciclo chiuso.

I risultati ottenuti permettono di osservare che la frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate si differenzia tra le diverse fasi produttive con la fase di svezzamento maggiormente critica; in particolare in questa fase risulta elevata la percentuale di *E. coli* resistenti alla colistina, antimicrobico identificato come *CIA* e per il quale sono state recentemente pubblicate delle raccomandazioni sull'utilizzo negli animali.

Nel complesso, gli antibiotici per i quali i batteri isolati negli animali mostrano più frequentemente resistenza sono: ampicillina, cloramfenicolo, sulfametossazolo, tetraciclina e trimetoprim, che corrispondono alle molecole cui sono più frequentemente resistenti i batteri isolati in liquame, acqua del canale adiacente il terreno fertirrigato e nei campioni fecali delle persone che lavorano negli allevamenti.

ABSTRACT

The use of antimicrobials, also in food producing animals, is the principal cause of antimicrobial resistance, which risks for human beings, animals and environment are widely recognized at global level.

Monitoring of antimicrobial resistance (AR) based on the determination of antimicrobial resistance profile of commensal bacteria, such as *E. coli*, is a useful tool to evaluate the phenomenon *status*.

With the aim to deep our knowledge on how AR disseminate to ecological niches pig farms related, two farrow-to-finish pig farms have been submitted to intensive monitoring.

Results show that the occurrence of *E. coli* resistant to tested antimicrobials is different

among the different production phases with weaning as the most critical; in particular in this phase there is a significant percentage of isolates that displays resistance to colistin, which is considered a *CIA* antimicrobial and which use in animals should follow specific rules.

Generally most of the *E. coli* isolated from animals showed resistance towards the following antimicrobials: ampicillin, chloramphenicol, sulphamethoxazole, tetracycline and trimethoprim and an analogous result was obtained as regards isolates from liquid manure, water from the fertilized soil and from faecal samples of the persons working in the farms.

INTRODUZIONE

Nei suini allevati a scopi zootecnici gli antimicrobici vengono utilizzati sia per trattare che per prevenire infezioni batteriche, contribuendo così a migliorare lo stato sanitario degli animali. L'utilizzo degli antimicrobici contribuisce però innegabilmente all'acquisizione di resistenza agli stessi da parte di batteri patogeni e commensali (Rosengren et al., 2007). Il fenomeno della antimicrobica resistenza (AR) ed i conseguenti potenziali rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente rappresentano un problema ampiamente riconosciuto a livello mondiale.

La relazione tra'utilizzo degli antimicrobici e sviluppo di resistenze nelle popolazioni batteriche esposte è stata largamente dimostrata e la necessità di mettere in atto strategie per un utilizzo più responsabile e prudente di questi farmaci, anche negli animali allevati a scopi zootecnici, è condivisa a livello globale (WHO, 2011; WHO, 2015).

L'uso prudente in medicina veterinaria è particolarmente orientato a quelle molecole definite *CIA* ovvero *critically important antimicrobials* il cui utilizzo è ancora efficace per contrastare alcune importanti infezioni batteriche nell'uomo, dovute in particolare a batteri multi resistenti (Commission Notice, 2015/C299/04).

Mentre la selezione di batteri resistenti agli antimicrobici è sicuramente dipendente dall'esposizione agli stessi, le modalità con cui le resistenze sono mantenute nelle comunità microbiche e/o diffuse anche in nicchie ecologiche diverse da quelle primariamente esposte (ad esempio dagli animali all'uomo), sono molteplici e rendono particolarmente complessa la definizione di questo fenomeno nella sua interezza (Heinemann et al., 2000; Allen et al., 2010; Sengupta et al., 2013).

Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici nelle popolazioni animali attraverso la determinazione del profilo di resistenza in batteri indicatori, quali *E. coli*, rappresenta un utile strumento per valutare lo *status* del fenomeno, il suo evolversi nel tempo e la potenzialità di diffusione delle resistenze nell'ambiente e nell'uomo (EFSA, 2008).

Al momento sono ancora scarsi gli studi a livello nazionale che descrivono la frequenza e diffusione della resistenza agli antimicrobici in *E. coli* isolati nei suini destinati alla produzione di alimenti.

Scopo di questo studio è approfondire la resistenza antimicrobica in allevamenti di suini a ciclo chiuso ed esplorarne le modalità di diffusione in nicchie ecologiche correlate all'allevamento stesso e che possono svolgere un ruolo importante nella diffusione di AR all'uomo, sia attraverso gli alimenti ma anche per esposizione diretta.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati due allevamenti di suini a ciclo chiuso (successivamente identificati come azienda A e azienda B) localizzati nel territorio di competenza dell'IZSV sulla base dei seguenti criteri: isolamento dell'allevamento e del suo ambiente circostante da altre realtà produttive zootecniche, presenza di aree contigue all'allevamento fertirrigate di routine con liquame proveniente unicamente dal sito produttivo, motivazione degli

allevatori a partecipare allo studio, eventuale presenza di canali di irrigazione accessibili. Ciascun allevamento è stato sottoposto a campionamento in due diversi istanti temporali, fine autunno e fine primavera.

Il campionamento è stato disegnato con l'obiettivo di collezionare sia materiale fecale dei suini nelle diverse fasi produttive che matrici ambientali, quali liquame, terreno fertirrigato e acqua dai canali di irrigazione adiacenti il terreno. Sono stati inoltre esaminati campioni fecali degli operatori coinvolti nella gestione dell'allevamento (collezionati in una unica occasione).

Per quanto riguarda i suini, le fasi produttive sottoposte a campionamento sono le seguenti: svezzamento, magronaggio, ingrasso, sala parto, gestazione e verri. Ciascuna sessione di campionamento ha previsto il campionamento di feci, liquame, terreno ed acqua, come di seguito descritto:

Feci: Al fine di garantire il campionamento rappresentativo di materiale fecale per ciascuna fase produttiva si è definito di procedere alla raccolta di 1 pool di feci, assemblando almeno tre box dalla stanza di campionamento, per un totale di 3 campioni (pool di feci) per fase produttiva, avendo cura, per ciascuna fase, di includere animali di diversa età.

Liquame: sono stati prelevati 3 campioni attraverso l'immersione di un contenitore in tre punti diversi nella vasca a cielo aperto.

Acqua: si è proceduto a prelevare due campioni per sessione di campionamento, uno nella parte vicina alla sponda, uno nel mezzo del canale.

Terreno: sono stati effettuati campioni di terreno in funzione di eventuali differenze di destinazione d'uso e dell'intervento di fertirrigazione.

In laboratorio i campioni di materiale fecale, acqua e terreno sono stati analizzati singolarmente, mentre i tre campioni di liquame sono stati riuniti in un unico pool per l'analisi. I campioni sono stati analizzati entro 48 ore dal conferimento, come di seguito descritto, ai fini dell'isolamento di *E. coli*.

Feci e Liquame: 90 ml di brodo di arricchimento TSB (Tryptone Soya Broth) sono stati addizionati a 10 grammi di campione iniziale. Le piastre di McC (MacConkey agar) successivamente seminate sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore.

Terreno: si è proceduto con una pre-incubazione del TSB di 4 ore a $37 \pm$ °C prima della semina in piastra.

Acqua: 9 ml di TSB sono stati addizionati ad 1 ml di acqua; dopo una pre-incubazione di 4 ore a 37 ± 1 °C si è proceduto a semina in McC.

Da ciascuna piastra di McC dopo 24 ore di incubazione si è proceduto a selezionare fino a 5 colonie singole sospette *E. coli* che sono state sottoposte a prove biochimiche-enzimatiche mediante gallerie di identificazione Api 20E (bioMérieux).

Ogni isolato confermato *E. coli* è stato sottoposto alla determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) utilizzando la tecnica di micro diluizione in brodo attraverso l'impiego di piastre commerciali Sensititre. Il valore di MIC è definito come la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce la crescita dei batteri. La differenza tra ceppi resistenti e sensibili, si è ottenuta comparando il valore di MIC ottenuto con il valore di cut-off epidemiologico (ECOFF) definito dall'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: Ampicillina (Amp), Cefotaxime (Cef), Ceftazidime (Cez), Cloramfenicolo (Chl), Ciprofloxacina (Cip), Colistina (Col), Gentamicina (Gen), Meropenem (Mero), Acido Nalidixico (Nal), Sulfametossazolo (Smx), Tetraciclina (Tet), Tigeciclin (Tgc), Trimethoprim (Tmp).

Analisi dei dati

I dati relativi alla determinazione della MIC sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva al fine di evidenziare la frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate per

ciascuna azienda, e per le diverse fasi produttive/matrici entro la stessa azienda. Al fine di verificare se esistano differenze significative tra le due aziende in termini di percentuale di isolati resistenti a ciascuna molecola è stato utilizzato il test Z. Valori di *p* inferiori a 0.10 sono considerati significativi. Inoltre i dati sono stati organizzati anche al fine di valutare la distribuzione di frequenza di isolati multi-resistenti, focalizzando l'attenzione sugli isolati con resistenze maggiori o uguali a 4 molecole. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software STATA12.

RISULTATI

Sono stati isolati e sottoposti a determinazione della MIC in totale 423 *E. coli*, di cui, per quanto riguarda l'azienda A: 180 da animali (30 per ogni categoria produttiva), 10 da liquame e 15 da uomo e per quanto riguarda l'azienda B: 185 da animale (sempre 30 per fase produttiva ad eccezione dei verri in cui sono stati isolati 35 ceppi da 7 campioni), 10 da liquame, 20 da uomo e 3 da acqua. In nessuno dei campioni di terreno sono stati isolati *E. coli*.

In tabella 1 viene riportata la percentuale di isolati risultati resistenti a ciascuna molecola testata per fase produttiva/matrice per ciascuna azienda. Per quanto riguarda l'acqua due delle tre colonie isolate sono risultate sensibili a tutti gli antibiotici testati mentre la terza è risultata resistente a: ampicillina, cloramfenicolo, tetraciclina, trimethoprim e sulfametossazolo.

In tabella 2 viene riportata la significatività del test statistico Z che permette di evidenziare le differenze tra le due aziende in termini di percentuale di isolati resistenti per ciascuna molecola e matrice.

Per quanto riguarda la valutazione della multi-resistenza, si è focalizzata l'attenzione sugli isolati da animali che sono risultati resistenti ad un numero di molecole uguale o maggiore di 4. Dei 365 *E. coli* da animale isolati complessivamente, 55 (15%) sono risultati sensibili a tutte le molecole testate, 310 (84.9%) sono risultati resistenti ad almeno una molecola, il 64% è risultato resistente ad un numero di molecole maggiore o uguale a 4.

Nel grafico 1 viene presentata la distribuzione di *E. coli* isolati nelle diverse categorie produttive risultati multiresistenti (maggiore o uguale a 4) focalizzando l'attenzione sui profili di multi-resistenza (ovvero combinazioni di molecole) maggiormente osservati.

Per quanto riguarda gli isolati da uomo, 14 sono risultati multiresistenti di cui 6 con profili equivalenti a quelli maggiormente osservati negli animali: 3 isolati sono risultati AmpSmxTetTmp e 3 AmpChlSmxTetTmp.

Tabella 1

ANTIMICROBICO (ECOFF)	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B
	SVEZZAMENTO		MAGRONAGGIO		INGRASSO		SALA PARTO		GESTAZIONE		VERRI		LIQUAME		UOMO	
Ampicillin (>8)	96,7	96,7	100,0	86,7	43,3	53,3	13,3	83,3	33,3	70,0	76,7	94,3	70,0	71,4	33,3	60,0
Cefotaxime (>0.25)	6,7	0,0	0,0	0,0	3,3	0,0	13,3	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ceftazidime (>0.5)	10,0	3,3	0,0	0,0	3,3	0,0	13,3	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Chloramphenicol (>16)	50,0	60,0	36,7	50,0	20,0	26,7	0,0	33,3	6,7	20,0	33,3	17,1	50,0	14,3	33,3	30,0
Ciprofloxacin (>0.064)	0,0	6,7	6,7	6,7	0,0	10,0	3,3	43,3	3,3	16,7	13,3	2,9	0,0	14,3	0,0	0,0
Colistin (>2)	73,3	56,7	16,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,3	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gentamicin (>2)	40,0	23,3	16,7	3,3	0,0	0,0	13,3	3,3	3,3	13,3	10,0	0,0	40,0	0,0	0,0	0,0
Meropenem (>0.125)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Nalidixic Acid (>16)	0,0	3,3	3,3	6,7	0,0	0,0	6,7	0,0	33,3	0,0	16,7	6,7	2,9	0,0	0,0	0,0
Sulphamethoxazole (>64)	93,3	96,7	100,0	93,3	46,7	53,3	40,0	70,0	46,7	53,3	90,0	74,3	80,0	28,6	80,0	80,0
Tetracycline (>8)	96,7	96,7	100,0	100,0	33,3	80,0	46,7	100,0	36,7	100,0	60,0	88,6	70,0	71,4	40,0	65,0
Tigecycline (>1)	6,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Trimethoprim (>2)	96,7	96,7	100,0	83,3	43,3	43,3	26,7	63,3	30,0	43,3	76,7	68,6	80,0	28,6	40,0	45,0
NUMERO isolati	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	35,0	10,0	10,0	15,0	20,0

Frequenza (espressa in %) di *E. coli* isolati da campioni prelevati presso le due aziende oggetto di studio classificati come resistenti a ciascuna molecola testata. I criteri di interpretazione per i valori di MIC (ECOFF) sono indicati in tabella (mg/L).

Tabella 2

ANTIMICROBICO (ECOFF)	SVEZZAMENTO	MAGRONAGGIO	INGRASSO	SALA PARTO	GESTAZIONE	VERRI	LIQUAME	UOMO	TOT. ANIMALE
A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B
Ampicillin (>8)	NS	> *	NS	< ***	< **	< **	NS	< +	< ***
Cefotaxime (>0.25)	NS	NS	NS	> *	> *	NS	NS	NS	> ***
Ceftazidime (>0.5)	> +	NS	NS	> *	> *	NS	NS	NS	> **
Chloramphenicol (>16)	NS	NS	NS	< ***	< +	> +	> *	NS	< *
Ciprofloxacin (>0.064)	< +	NS	< *	< ***	< *	> +	> +	NS	< ***
Colistin (>2)	> +	> **	NS	NS	NS	> +	NS	NS	> *
Gentamicin (>2)	> +	> *	NS	> +	< +	> *	> *	NS	> *
Meropenem (>0.125)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nalidixic Acid (>16)	NS	NS	< +	< ***	< **	NS	NS	NS	< ***
Sulphamethoxazole (>64)	NS	> +	NS	< **	NS	> +	> **	NS	NS
Tetracycline (>8)	NS	NS	< ***	< ***	< ***	< **	NS	< +	< ***
Tigecycline (>1)	> +	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	> +
Trimethoprim (>2)	NS	> **	NS	< **	NS	NS	> **	NS	NS

Significatività (*p*-value) del test statistico Z condotto sulle percentuali di *E. coli* resistenti alle molecole testate nelle due aziende poste a confronto: NS= non significativo; +, *, **, *** indicano rispettivamente un *p*-value <0.10, <0.05, <0.001, <0.0001; >/< indicano se nell'azienda A la percentuale di isolati resistenti è risultata significativamente >/< rispetto all'azienda B.

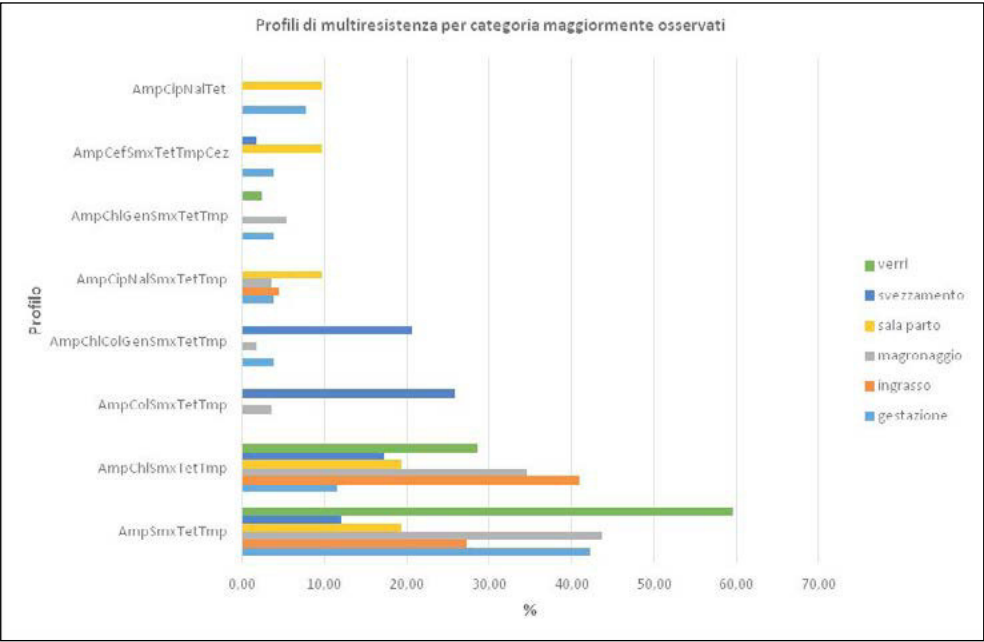


Grafico 1

Profili di multi resistenza maggiormente osservati in *E. coli* isolati nelle due aziende per le diverse fasi produttive.

DISCUSSIONE

In merito alla frequenza di *E. coli* risultati resistenti alle molecole testate nelle due aziende, osservando la tabella 1 è possibile affermare che indipendentemente dall'origine dei campioni e dalla matrice analizzata le molecole cui una elevata percentuale dei ceppi è risultata resistente sono: ampicillina, cloramfenicolo, sulfametossazolo, tetraciclina e

trimethoprim. Per quanto riguarda i suini questo è coerente con quanto evidenziato da Osterberg e collaboratori (2016) che hanno ottenuto analogo risultato sottoponendo ad analisi *E. coli* isolati da campioni di feci di suini, prossimi alla macellazione, collezionati presso allevamenti italiani.

Per quanto riguarda il risultato relativo ai campioni umani, confrontando i dati con quelli ottenuti nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzata (N. 2010-RF-2317095) in cui sono stati sottoposti a determinazione della MIC 338 *E. coli* isolati da 101 persone che non frequentano allevamenti suini (dati non ancora pubblicati) è possibile evidenziare che gli *E. coli* oggetto del presente lavoro, diversamente dai quelli della sub-popolazione non esposta agli allevamenti, non presentano resistenza a molecole quali cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina, gentamicina e acido nalidixico ma presentano con una frequenza molto più elevata resistenza alle molecole succitate (grafico 2). Non è quindi da escludere che l'esposizione all'ambiente di allevamento possa influenzare in modo importante il profilo di resistenza batterica negli addetti ai lavori.

Osservando la tabella 1, si evidenziano delle differenze tra le diverse fasi produttive: in particolare, gli isolati da suini in fase svezzamento, magronaggio e da verri risultano con maggiore frequenza resistenti alle molecole testate rispetto alle altre fasi produttive. Osservando l'andamento delle resistenza dallo svezzamento all'ingrasso è possibile evidenziare come in quest'ultima fase la percentuale di isolati resistenti sia generalmente inferiore rispetto alle precedenti.

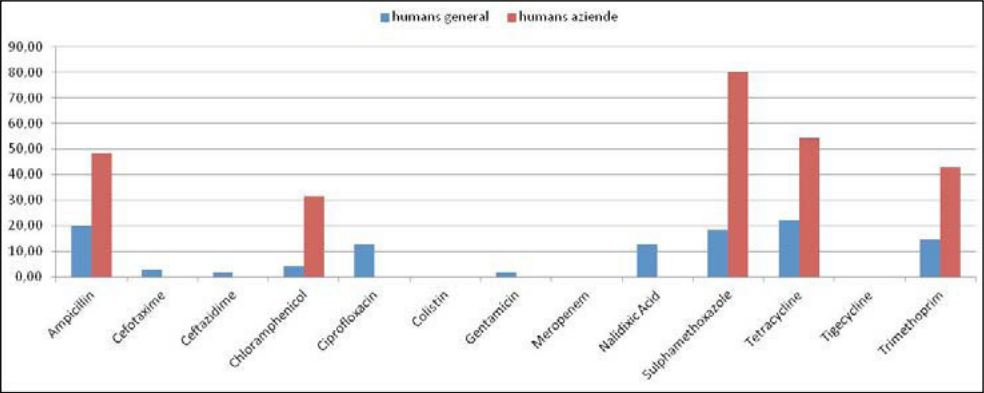
Pur con delle diversità tra le due aziende, vi sono delle resistenze esclusive di alcune fasi e particolarmente evidente è la resistenza alla colistina, antibiotico identificato come CIA e per il quale sono state recentemente pubblicate delle raccomandazioni nell'utilizzo negli animali (EMA 2016), nella fase di svezzamento.

Infine, pur essendo i risultati che esitano dalle due aziende generalmente sovrapponibili, alcune differenze sono evidenti in particolare nelle fasi gestazione e sala parto (tabella 2).

Le differenze riscontrate potrebbero essere imputabili ad un diverso utilizzo degli antibiotici nelle diverse fasi e nelle due aziende. I dati riguardanti le modalità di gestione degli allevamenti permettono di confermare questa ipotesi, ovvero per entrambe le aziende gli animali in fase svezzamento sono quelli maggiormente sottoposti a trattamenti antibiotici e l'utilizzo della colistina è emerso essere riservato alla fase svezzamento; al contrario dagli stessi dati non è possibile chiarire il profilo osservato per la gestazione, la sala parto ed i verri in cui gli animali risultano essere sottoposti solo occasionalmente a trattamenti.

Per quanto riguarda i profili di multi resistenza due (AmpSmxTetTmp e AmpChlSmxTetTmp) risultano comuni a tutte le fasi produttive e sono stati riscontrati anche con elevata frequenza negli isolati da liquame, uomo e acqua; questo dato permette ulteriormente di porre l'attenzione sulle modalità di diffusione delle resistenze attraverso la circolazione di batteri commensali che possono essere trasferiti dagli animali all'ambiente attraverso il liquame e all'uomo per contatto diretto ma anche attraverso l'ambiente.

Grafico 2



Resistenza agli antibiotici di *E.coli* isolati da persone che lavorano presso le aziende oggetto di studio (*humans aziende*) e popolazione estranee all'allevamento dei suini (*humans general*, dati dalla ricerca N. 2010-RF-2317095)

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di collezionare numerosi dati sul profilo di resistenza di *E. coli* commensali isolati nell'ambito di diverse nicchie ecologiche correlate all'allevamento del suino a ciclo chiuso.

Pur con delle differenze tra le due aziende sottoposte ad indagine è stato possibile evidenziare che vi sono differenze tra le varie fasi produttive in termini di frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate. Ciò potrebbe dipendere da un diverso utilizzo degli antibiotici nelle diverse fasi produttive che meriterebbe un ulteriore approfondimento. Inoltre è stato possibile evidenziare come le resistenze maggiormente osservate negli animali fossero le stesse osservate anche nel liquame, nelle persone che lavorano presso gli allevamenti e nell'unico isolato derivante dal canale adiacente al terreno fertirrigato. Considerando lo scarso successo di isolamento di *E. coli* nei campioni ambientali (terreno ed acqua), approcci diversi per esplorare maggiormente le modalità di diffusione delle resistenze in queste nicchie ecologiche sono auspicabili.

Tenendo conto inoltre che le modalità con cui la resistenza agli antibiotici può persistere, indipendentemente dall'esposizione agli stessi, la trasmissione di batteri resistenti dagli animali all'ambiente non dovrebbe essere sottovalutata, in quanto quest'ultimo potrebbe fungere da serbatoio di resistenze che potrebbero potenzialmente persistere e diffondersi anche a seguito di una riduzione di utilizzo delle molecole negli animali.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Ministero della Salute per avere finanziato la ricerca corrente IZSVE 15/14 nell'ambito della quale si sono svolte le attività descritte.

Si ringraziano gli allevatori ed i loro collaboratori che hanno messo a disposizione le loro aziende ed il loro tempo.

BIBLIOGRAFIA

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nature Reviews Microbiology, volume 8, April 2010, 251-259.

Commission Notice, 2015/C 299/04. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine.

European Medicines Agency, 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.

EFSA. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. The EFSA journal (2008) 141: 1-44.

Heinemann, J.A., Ankenbauer, R.G., Amabile-Cuevas, C.F., 2000. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discov. Today* 5, 195–204. doi:10.1016/S1359-6446(00)01483-5

Österberg, J., Wingstrand, A., Nygaard Jensen, A., Kerouanton, A., Cibi, V., Barco, L., Denis, M., Aabo, S., Bengtsson, B., 2016. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Pigs in Organic and Conventional Farming in Four European Countries. *PLoS One* 11, e0157049. doi:10.1371/journal.pone.0157049

Rosengren, L.B., Waldner, C.L., Reid-Smith, R.J., Dowling, P.M., Harding, J.C.S., 2007. Associations Between Feed and Water Antimicrobial Use in Farrow-to-Finish Swine Herds and Antimicrobial Resistance of Fecal *Escherichia coli* from Grow-Finish Pigs. *Microb. Drug Resist.* 13, 261–270. doi:10.1089/mdr.2007.781

Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., Grossart, H.P., 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2013.00047

World Health Organisation, 2011. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. *World Heal. Organ.* 1–88. doi:www.euro.who.int/en/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe

World Health Organization, 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO Press 1–28.

VALUTAZIONE DELLA MIC (*MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION*) DI CEPPI DI *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* E *MYCOPLASMA HYORHINIS* ISOLATI NEL SETTORE SUINICOLO ITALIANO

EVALUATION OF MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E MYCOPLASMA HYORHINIS STRAINS ISOLATED IN THE ITALIAN PIG INDUSTRY

CATANIA S.¹, MORONATO M. L.¹, FLAMINIO B.¹, USTULIN M.², VIO D.², GOBBO F.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (PD)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

Parole chiave: MIC (Minimum Inhibitory Concentration), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*

Key words: MIC (Minimum Inhibitory Concentration), *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyorhinis*

Riassunto

I micoplasmi sono piccoli microrganismi privi di parete cellulare, considerati “fastidious” nella coltivazione *in vitro*, nel settore suinico il *Mycoplasma hyopneumoniae* è riconosciuto da tempo come l’agente della polmonite enzootica suina, ma recentemente si sta rivalutando anche il possibile ruolo patogeno del *Mycoplasma hyorhinis*. Il controllo di questi patogeni può avvenire tramite pratiche di profilassi indiretta (vaccinazione) o tramite l’utilizzo di antibiotici per il contenimento della patologia e per garantire il benessere animale. Recentemente la UE richiede al settore zootecnico una razionalizzazione dell’uso degli antibiotici e in particolare di quelli considerati criticamente importanti per l’uomo, inoltre si raccomanda che la scelta dell’antibiotico da utilizzare sia corredata da dati laboratoristici di farmaco-suscettibilità al fine di utilizzare molecole la cui efficacia sia garantita per lo meno da studi *in vitro*. Nel presente contributo si riportano i risultati di uno studio di MIC per un pannello di 10 antibiotici (doxiciclina, enrofloxacin, eritromicina, florfenicolo, lincomicina, ossitetraciclina, spiramicina, tiamulina, tilmicosina e tilosina) di 22 ceppi di *M. hyorhinis* e 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* isolati da polmoni di suini da ingrasso nel territorio nazionale (2012-2016) con forma respiratoria ascrivibile a micoplasmosi.

Abstract

Mycoplasmas are small prokaryotic microorganisms, which lack of a cell wall and are considered fastidious in *in vitro* cultivation. In the swine sector, *Mycoplasma hyopneumoniae* is defined as the causative agent of enzootic pneumonia, but recently the role of other species, like *Mycoplasma hyorhinis*, in the pathogenesis of respiratory disease is under debate. The vaccination or the antibiotic treatment are the available tools for the management and control of the disease. Recently, the UE calls for a conscious use of antibiotic molecules, especially those relevant for public human health, and for a rational choice of the best drug, which should be based on *in vitro* studies. In the present study, 22 *Mycoplasma hyorhinis* strains and 9 *Mycoplasma hyopneumoniae* strains were isolated from swine pneumonic lungs in Italy from 2012 to 2016. All the strains were tested for MIC using a panel of 10 different drugs (doxycycline, enrofloxacin, erythromycin, florfenicol, lincomycin, oxytetracycline, spiramycin, tiamulin, tilmicosin, tylosin) and their analysis are reported in the present study.

INTRODUZIONE

I micoplasmi sono piccoli microrganismi privi di parete cellulare, considerati “fastidious” nella coltivazione *in vitro*. Esistono numerose specie capaci di provocare patologie nei diversi settori zootecnici con considerevoli perdite economiche. Nel settore suinicolo, il *Mycoplasma hyopneumoniae* è riconosciuto da tempo come l’agente della polmonite enzootica suina, il *Mycoplasma hyosynoviae* è considerato responsabile di sinovite ed artrite ed infine è ancora oggetto di discussione il possibile ruolo patogeno del *Mycoplasma hyorhinis*. Al contrario, *M. hyopharyngis* e *M. flocculare* vengono considerati commensali delle prime vie aeree.

Il controllo di questi patogeni è basato sulla prevenzione dell’infezione attraverso l’utilizzo di vaccini (se disponibili) o sul contenimento della patologia attraverso la terapia antibiotica. La difficoltà di crescita di questi microrganismi (e in particolare del *M. hyopneumoniae*) congiuntamente alla richiesta di una diagnosi tempestiva, ha inevitabilmente portato alla diffusione di metodiche di diagnosi diretta di tipo biomolecolare, tralasciando metodi classici come l’isolamento colturale, poiché considerato dispendioso sia in termini di tempo, che di personale. Nonostante ciò, alcuni gruppi di lavoro continuano a studiare come migliorare la crescita *in vitro* di tali microrganismi, tramite l’allestimento di nuovi *media* culturali, consci del valore aggiunto di detenere un isolato batterico vitale (per studi di antibiotico-suscettibilità, genotipizzazione, produzione di vaccini stabulogeni, infezioni sperimentali, etc.). Inoltre, ci troviamo di fronte ad una puntuale e corretta richiesta di un uso razionale del farmaco, quindi per il Medico Veterinario la conoscenza del grado di attività di determinati antimicrobici nei confronti di specifici patogeni circolanti può rappresentare un’utile risorsa a supporto delle sue attività professionali. A tal fine, per avere una stima della suscettibilità o della resistenza di un determinato microrganismo agli antimicrobici, si può utilizzare il calcolo della MIC (Minima Concentrazione Inibente), poiché considerata dalla comunità scientifica il *gold-standard* tra gli ASTs (*Antimicrobial Susceptibility Tests*). La MIC rappresenta “la più bassa concentrazione di un antibiotico in grado di inibire la crescita e/o il metabolismo di un microrganismo *in vitro*”. In aggiunta, integrando i valori di MIC calcolati con i *breakpoints* disponibili (ossia le concentrazioni, espresse in µg/ML, definite da organizzazioni internazionali come soglia per esprimere la sensibilità o la resistenza dei microrganismi agli antibiotici), si può avere una valutazione dei dati *in vitro* sulla possibile sensibilità o resistenza del ceppo nei confronti della molecola testata. Tale metodica, inoltre, è l’unico AST applicabile a microrganismi fastidiosi come i micoplasmi.

Scopo del presente contributo è quello di condividere uno studio sulla valutazione della MIC di 22 ceppi di *M. hyorhinis* e 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* isolati da polmoni di suini da ingrasso nel territorio nazionale (2012-2016) con forma respiratoria ascrivibile a micoplasmosi.

MATERIALI E METODI

I ceppi batterici sono stati coltivati a partire da campioni di polmoni suini presentanti lesioni anatomopatologiche compatibili con micoplasmosi. I ceppi selezionati per tale studio (2012-2016) derivano da campioni di polmone di suino da ingrasso di diverse età e provenienti da allevamenti diversi del territorio nazionale. I campioni sono stati quindi inoculati in terreni selettivi *home made* e commerciali (in formato liquido e agarizzato) e coltivati a +37°C al 5% CO₂ fino alla presenza di crescita riferibile a *Mycoplasma spp.*. L’identificazione è avvenuta tramite metodica 16S-PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e una volta certi della purezza e vitalità dell’isolato si è proceduto alla sua propagazione in 10ML di produzione madre. Avvenuta la crescita si è proceduto a subaliquotare la produzione madre in 10 parti, stoccate a -80°C per almeno 24 ore. Si è poi proceduto alla titolazione della produzione madre utilizzando piastre da 96 pozzetti, il titolo finale espresso in UCC/ML (*Unit Changing Color*) viene calcolato secondo il MPN (*Most Probable Number*). Per eseguire il test, l’inoculo batterico (10³-10⁵ UCC/ML) è stato dispensato in piastre commerciali da 96 pozzetti con antibiotici *on demand* (Merlin Diagnostika®), incubate a 37±1°C fino alla rilevazione di crescita nel pozzetto denominato

controllo positivo (inoculo batterico in assenza di sostanze ad azione antimicrobica). Si riporta di seguito gli antibiotici presenti nella piastra con relativi *breakpoint* di sensibilità e resistenza (µg/ML) disponibili in letteratura: doxiciclina (≤4, ≥16), enrofloxacin (≤0.5, ≥2), eritromicina (≤1, ≥4), florfenicolo (≤2, ≥8), lincomicina (≤1, ≥8), ossitetraciclina (≤4, ≥16), spiramicina (≤2, ≥8), tiamulina (≤8, ≥16), tilmicosina (≤16, ≥32) e tilosina (≤1, ≥4). I risultati ottenuti sono stati integrati con i valori di *breakpoint*, permettendo di classificare l’isolato come sensibile, intermedio o resistente all’antibiotico testato. Si è proceduto inoltre a calcolare la MIC₅₀ e MIC₉₀ dei ceppi, cioè rispettivamente il valore di MIC capace di inibire la crescita del 50 % e 90% dei ceppi testati di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*.

RISULTATI

Si riporta in Tab. 1 e Tab. 2 i risultati MIC, rispettivamente per 9 ceppi di *M. hyopneumoniae* e 22 ceppi di *M. hyorhinis*

Tab. 1 Risultati MIC (µg/ML) di 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)
Tab. 1 MIC results (µg/ML) of 9 isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

M. HYOPNEUMONIAE											
Strain ID	Year	Doxy	Enro	Eri	Florf	Linco	Ossi	Spira	Tiam	Tilm	Til
HYOP 1	2012	1,00	0,25	>8	<0,5	<0,5	1,00	2,00	0,25	8,00	0,50000
HYOP 2	2012	0,50	0,50	>8	<0,5	<0,5	1,00	1,00	1,00	16,00	0,125
HYOP 3	2012	0,25	1,00	>8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,0625	1,00	0,03125
HYOP 4	2015	2,00	2,00	>8	<0,5	<0,5	2,00	<0,5	0,25	2,00	0,06
HYOP 5	2015	0,50	2,00	>8	1,00	<0,5	1,00	1,00	0,50	4,00	0,125
HYOP 6	2016	0,50	2,00	>8	<0,5	<0,5	1,00	<0,5	0,25	1,00	0,0625
HYOP 7	2016	1,00	2,00	>8	<0,5	<0,5	1,00	<0,5	0,25	2,00	0,0625
HYOP 8	2016	0,25	1,00	>8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,25	1,00	0,0625
HYOP 9	2016	1,00	2,00	>8	<0,5	<0,5	1,00	<0,5	0,125	1,00	0,0625

Tab.2 Risultati MIC (µg/ML) di 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)
Tab.2 MIC results (µg/ML) of 22 isolates of *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)

M. HYORHINIS											
Strain ID	Year	Doxy	Enro	Eri	Florf	Linco	Ossi	Spira	Tiam	Tilm	Til
HYORH 1	2012	0,25	0,50	>8	<0,5	<0,5	<0,5	2,00	0,25	2,00	0,25
HYORH 2	2012	<0,125	1,00	>8	<0,5	>32	<0,5	4,00	0,25	>32	16,00
HYORH 3	2012	1,00	4,00	>8	<0,5	<0,5	4,00	<0,5	0,125	16,00	0,25
HYORH 4	2012	1,00	4,00	>8	1,00	>32	2,00	>16	0,50	>32	>32
HYORH 5	2012	0,50	4,00	>8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,125	2,00	0,0625
HYORH 6	2012	0,50	2,00	>8	<0,5	>32	<0,5	8,00	0,125	>32	32,00
HYORH 7	2012	2,00	4,00	>8	1,00	>32	2,00	>16	0,50	>32	>32
HYORH 8	2012	8,00	4,00	>8	<0,5	>32	8,00	2,00	0,25	>32	32,00
HYORH 9	2012	1,00	4,00	>8	1,00	>32	2,00	>16	0,50	>32	>32
HYORH 10	2013	<0,125	8,00	>8	<0,5	>32	<0,5	16,00	0,25	>32	>32
HYORH 11	2014	2,00	4,00	>8	1,00	>32	4,00	16,00	0,250	>32	32,00
HYORH 12	2015	1,00	4,00	>8	<0,5	<0,5	2,00	<0,5	0,250	8,00	0,50
HYORH 13	2015	1,00	4,00	>8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,250	4,00	0,0625
HYORH 14	2015	0,50	2,00	>8	<0,5	<0,5	1,00	<0,5	0,250	16,00	0,25
HYORH 15	2015	<0,125	4,00	>8	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5	0,250	4,00	0,25
HYORH 16	2015	4,00	4,00	>8	1,00	<0,5	4,00	<0,5	1,000	16,00	0,50
HYORH 17	2015	2,00	4,00	>8	2,00	>32	4,00	>16	1,000	>32	>32
HYORH 18	2015	16,00	4,00	>8	2,00	>32	16,00	16,00	0,500	>32	>32
HYORH 19	2015	1,00	4,00	>8	1,00	<0,5	2,00	<0,5	0,25	4,00	0,25
HYORH 20	2015	1,00	4,00	>8	1,00	<0,5	4,00	<0,5	0,25	4,00	0,50
HYORH 21	2015	1,00	2,00	>8	<0,5	<0,5	4,00	<0,5	0,13	4,00	0,25
HYORH 22	2016	2,00	4,00	>8	1,00	<0,5	4,00	<0,5	0,25	8,00	0,50

Si riportano in Tab. 3 e 4 i valori di MIC50 e MIC90 dei ceppi testati rispettivamente di *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis* per le diverse molecole antibiotiche.

Tab. 3 MIC50 e 90(µg/ML) di 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

Tab. 3 MIC50 and 90 (µg/ML) of 9 isolates of *Mycoplasma hyopneumoniae* (2012-2016)

ABT	MIC50 (µg/ML)	MIC90 (µg/ML)
Doxy	0,5	1
Enro	1	2
Eri	>8	>8
Florfenicol	<0,5	<0,5
Lincomicina	<0,5	<0,5
Ossitetraciclina	1	1
Spiramicina	<0,5	1
Tiamulina	0,25	0,5
Tilmicosina	2	8
Tiludina	0,0625	0,125

Tab.4 Risultati MIC50 e 90 (µg/ML) di 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)

Tab.4 MIC50 and 90 (µg/ML) of 22 isolates of *Mycoplasma hyorhinis* (2012-2016)

ABT	MIC50 (µg/ML)	MIC90 (µg/ML)
Doxy	1	4
Enro	4	8
Eri	>8	>8
Florfenicol	0,5	1
Lincomicina	0,5	32
Ossitetraciclina	2	4
Spiramicina	0,5	16
Tiamulina	0,25	0,5
Tilmicosina	16	32
Tiludina	0,5	32

DISCUSSIONE

I 9 ceppi di *Mycoplasma hyopneumoniae* hanno mostrato una elevata sensibilità al florfenicol, lincomicina, spiramicina tilosina, tiamulina, tilmicosina, una buona sensibilità alla ossitetraciclina e doxiciclina, diminuita suscettibilità all’enrofloxacin e completa resistenza nei confronti del macrolide eritromicina. La analisi della MIC50 e MIC90 (Tab.3), seppur con un numero ridotto di ceppi, supporta tali dati ed evidenzia popolazioni microbiche con ridotta suscettibilità per alcune molecole testate.

I 22 ceppi di *Mycoplasma hyorhinis* hanno mostrato una elevata sensibilità alla tiamulina e florfenicol, una buona sensibilità alla ossitetraciclina e doxiciclina. Per gli antibiotici

lincomicina, spiramicina e tilosina si osserva una suscettibilità variabile con popolazioni altamente sensibili o altamente resistenti. Per l’antibiotico enrofloxacin 20 ceppi presentano valori di resistenza e tutti i ceppi risultano resistenti alla eritromicina, si rileva una diminuita suscettibilità al macrolide tilmicosina con 10 ceppi che presentano valori di MIC superiori al breakpoint di resistenza (32µg/ML).

CONCLUSIONI

I risultati MIC consentono di mettere in evidenza buoni margini terapeutici per il *M. hyopneumoniae* e seppur con alcune differenze anche per il *Mycoplasma hyorhinis*. Il presente studio dimostra come sia possibile valutare l’antibiotico suscettibilità anche di microrganismi considerati fastidiosi e la cui terapia spesso è basata sull’utilizzo di antibiotici considerati criticamente importanti.

Consci che per alcuni microrganismi (come il *M. hyopneumoniae*) il dato MIC non possa essere fruibile tempestivamente per la terapia dello specifico gruppo infetto, rilanciamo l’idea di MIC intesa come “strumento dinamico” e quindi non focalizzato solamente su un caso clinico. Infatti, la raccolta dei dati MIC finalizzata a generare un database storico, aziendale o di filiera, fornirà utili informazioni per la corretta gestione della patologia attraverso un utilizzo più razionale del farmaco fondato su dati di laboratorio. Tale approccio congiunto tra libero professionista e laboratorio potrebbe aiutare ad evitare pressioni selettive in campo, svolgendo quindi un ruolo proattivo nella lotta alla AR. Parallelamente, tali dati risulterebbero un’utile risorsa per la comunità scientifica come strumento di monitoraggio dello sviluppo di fenomeni di antibiotico resistenza in micro o macro aree.

BIBLIOGRAFIA

Hannan PC., (2000) “Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species”. Vet. Res. 31, 373–395.

Fincato A., Ustulin M., Santone C., Moronato M.L., Vio D., Catania S. (2016) “Evaluation of different methods for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae*”. XVII Congresso SIDILV, 28-30 settembre 2016, Pacengo Lazise (VR), 202-203.

Catania S., Ruben S. Rosales, Ustulin M., Fincato A., Gobbo F., Vio D.. (2015) “Diagnosi diretta mediante isolamento ed identificazione di *Mycoplasma* spp. nel settore suinicolo, un’ulteriore possibilità diagnostica”. XLI Meeting annuale della società italiana di patologia ed allevamento dei suini. 19-20 Marzo 2015, Montichiari (BS), 249-254.

Flaminio B, Fincato A., Sturaro A., Santone C., Gobbo F., Catania S.. (2014) “Minimum Inhibitory Concentration of mycoplasma species: a chance for a practitioner, a challenge for the laboratorist”. 3rd EAVLD Congress, Pisa, 12-15 Ottobre 2014, 36

***ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOSSIGENI ISOLATI IN
FOCOLAI DI PWD IN ITALIA, BELGIO-OLANDA E SPAGNA:
PREVALENZA DEI FATTORI DI VIRULENZA**

**ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED DURING
PWD OUTBREAKS IN ITALY, BELGIUM-THE NETHERLANDS
AND SPAIN: PREVALENCE OF VIRULENCE FACTORS**

DE LORENZI G., GHERPELLI Y., BONILAUDI P., MARZANI K., DOTTORI M.,
TORRI D., PANGALLO G., LUPPIA.

IZSLER, Sezione di Reggio Emilia

Parole chiave: Fattori di virulenza, ETEC, Diarrea post svezzamento

Key words: Virulence factors, ETEC, Post-weaning diarrhoea

Riassunto

Nel presente studio sono stati inclusi 543 ceppi di *Escherichia coli* enterotossici (ETEC) isolati nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016, da 495 focolai di diarrea post svezzamento (PWD) occorsi in aziende suinicole in Italia, Belgio-Olanda e Spagna. I ceppi sono stati genotipizzati impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine (tossine termostabili, STa e STb, tossina termolabile, LT e tossina Shiga-like, Stx2e).

La prevalenza delle principali fimbrie e tossine tra i ceppi inclusi nello studio è risultata essere: F4 (45,4%), F18 (44,8%), STa (37,9%), STb (35,4%), LT (25,4%), Stx2e (1,3%) in Italia; F4 (52,3%), F18 (40,3%), STa (37,7%), STb (38,9%), LT (22,2%), Stx2e (1,2%) in Belgio-Olanda; F4 (45,8%), F18 (44,2%), STa (34,1%), STb (34,5%), LT (31,1%), Stx2e (0,3%) in Spagna.

Nella maggior parte dei casi è stato isolato un solo virotipo per ogni focolaio, tuttavia nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio.

Per gli allevamenti in cui è stato possibile seguire focolai ricorrenti di PWD da ETEC nel periodo considerato si rileva che in circa la metà di questi, sia in Italia, sia in Belgio sono stati isolati nella stessa azienda diversi virotipi di ETEC, in tutti i casi con un'alternanza di ceppi presentanti fimbrie F4 e F18.

Abstract

This study investigated the prevalence of fimbrial (F4, F5, F6, F18 and F41) and toxin (LT, STa, STb and Stx2e) genes of 543 enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) by PCR among 495 outbreaks of enteric colibacillosis occurred in the post weaning period in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain in a period of two years (from January 2015 to December 2016). The prevalence of the main fimbriae among ETEC isolated from the outbreaks occurred in the different countries included in the study were: F4 (45,4%), F18 (44,8%) in Italy; F4 (52,3%), F18 (40,3%) in Belgium-The Netherlands; F4 (45,8%), F18 (44,2%) in Spain. The prevalence of genes encoding for the toxins was: STa (37,9%), STb (35,4%), LT (25,4%), Stx2e (1,3%) in Italy; STa (37,7%), STb (38,9%), LT (22,2%), Stx2e (1,2%) in Belgium-The Netherlands; STa (34,1%), STb (34,5%), LT (31,1%), Stx2e (0,3%) in Spain.

In most of the cases one virotype have been isolated in each outbreak, but more than one virotype has been involved during the same outbreak in 2.4%, 18.5% and 3.5% of them in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain respectively.

In about half of the farms, where recurrent outbreaks of ETEC PWD occurred, both in Italy (6/13) and in Belgium-The Netherlands (10/17), different virotypes of ETEC in subsequent outbreaks have been isolated (in all cases with an alternation of strains presenting fimbriae F4 and F18).

INTRODUZIONE

La diarrea post svezzamento (PWD) da *Escherichia coli* rappresenta una delle principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino, determinando un aumento della mortalità e un peggioramento delle performance produttive nei soggetti che superano la fase acuta della malattia, oltre ad un aumento dei costi produttivi per l'acquisto di farmaci (Van Beers-Schreurs et al., 1992; Fairbrother et al., 2005). Nei gruppi di suini colpiti dalla malattia si osserva anoressia o disoressia con comparsa di diarrea acquosa pochi giorni dopo lo svezzamento e conseguente marcata disidratazione, diminuzione delle performance produttive e mortalità. A volte la comparsa di diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa. I ceppi classificati come *E. coli* enterotossici (ETEC) rappresentano la più importante causa di PWD nel suino e sono caratterizzati dalla presenza di adesine fimbriali che permettono l'attacco del batterio a recettori specifici localizzati sugli enterociti e dalla capacità di produrre enterotossine che alterano l'omeostasi dei fluidi del piccolo intestino, causando un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume e determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD (Fairbrother et al., 2012).

I fattori di adesività o antigeni fimbriali che si rinvencono più di frequente nei ceppi ETEC agenti di diarrea post svezzamento nel suino sono F4 (un tempo noto come K88) e F18. Altri antigeni fimbriali isolati meno frequentemente sono F5 (K99), F6 (987P) e F41 (Kwon et al., 2002; Frydendahl, 2002; Chen et al., 2004; ; Vu Khac et al., 2006) che sono invece regolarmente riscontrati in ETEC isolati nel periodo neonatale.

Le fimbrie F4 a loro volta si suddividono in F4ab, F4ace F4ad, sebbene la maggior parte dei casi di PWD sia causata da ceppi di *E. coli* F4ac. Le fimbrie F18 invece possiedono due varianti antigeniche ovvero F18ab, presente generalmente nella malattia degli edemi e la variante F18ac, associata a casi di PWD (Rippinger et al., 1995; Fairbrother et al., 2012).

Le principali enterotossine prodotte dagli ETEC del suino sono la tossina termolabile (LT) e due tossine termostabili (STa e STb). La combinazione dei diversi fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie e tossine, va a determinare il virotype. Una adesina cosiddetta non-fimbriale e denominata AIDA (*adhesin involved in diffuse adherence*) e una tossina termo stabile EAST1 (*enteroaggregative heat stable enterotoxin*) sono state descritte in ceppi di ETEC isolati da casi di diarrea nel suino. Per entrambi questi potenziali fattori di virulenza, tuttavia, il reale ruolo nell'insorgenza delle forme cliniche di colibacillosi non è ancora completamente chiarito.

Alcuni ceppi ETEC sono in grado di produrre sia le enterotossine sopracitate sia la tossina Shiga-like (Stx2e), quest'ultima generalmente associata ai ceppi STEC F18 Stx2e responsabili della malattia degli edemi. I ceppi ETEC che possiedono i geni sia per la produzione delle enterotossine, sia della tossina Stx2e si comportano come ceppi enterotossici, provocando la caratteristica colibacillosi enterica piuttosto che la forma clinica e le lesioni tipiche della malattia degli edemi (Fairbrother et al., 2012).

L'obiettivo di questo studio è quello di descrivere la prevalenza dei geni di virulenza in ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD in Italia, Olanda-Belgio e Spagna nel periodo 2015-2016.

MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono stati inclusi ceppi di *E. coli* enterotossici (ETEC) isolati presso l'IZSLER (sezione diagnostica di Reggio Emilia) nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016 da 495 focolai di PWD nel suino in Italia (164), Belgio-Olanda (216) e Spagna (115).

I ceppi sopracitati sono stati isolati da materiale patologico (da 3 a 5 campioni conferiti per ogni focolaio) costituito da feci, tamponi rettali, intestini o carcasse di suini deceduti con quadri clinici riferibili a colibacillosi enterica, insorti 1-3 settimane post svezzamento. Le feci, i tamponi rettali o il contenuto degli intestini sono stati seminati su terreno Agar sangue al 5% e su Hektoen agar e incubati per 18-24 ore a 37°C in ambiente aerobio. Dopo il periodo di incubazione previsto è stata eseguita una valutazione morfologica delle colonie cresciute sui terreni colturali sopracitati e in particolare è stata valutata la presenza di emolisi su agar sangue. A questo proposito occorre sottolineare come la maggior parte degli ETEC isolati da casi di diarrea post-svezzamento siano emolitici quando coltivati su terreni a base di sangue.

Per ogni focolaio sono stati scelti, dopo la valutazione morfologica e la conferma biochimica, da 2 a 3 ceppi di *E. coli*, isolati da altrettanti campioni patologici, da sottoporre a genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine Sta, STb, LT e Stx2e (Casey e Bosworth, 2009).

I ceppi sono stati classificati come ETEC se in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie ed uno per le tossine. I ceppi dotati di geni codificanti per le fimbrie F18, per una o più enterotossine e per la tossina Stx2e sono stati classificati come ETEC. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti ceppi appartenenti allo stesso virotype, questo è stato conteggiato come unico isolato nel calcolo della prevalenza.

In Italia e in Belgio-Olanda per 13 e 17 aziende rispettivamente, sono stati analizzati diversi conferimenti di materiale patologico prelevato da diversi focolai di colibacillosi (da un minimo di 2 ad un massimo di 6 per azienda) verificatisi nel periodo considerato. Sono stati pertanto valutati e messi a confronto i virotipi isolati in focolai successivi occorsi nella stessa azienda.

Le prevalenze di fimbrie, tossine e virotipi tra le differenti origini dei ceppi (Italia, Belgio-Olanda e Spagna) sono state comparate tramite test chi quadrato di Pearson, con livello di significatività $p < 0.05$.

RISULTATI

Seguendo i criteri sopra riportati sono stati inclusi nello studio e nel calcolo della prevalenza dei fattori di virulenza 543 ceppi ETEC isolati in 495 focolai nel periodo compreso tra gennaio 2015 e dicembre 2016. La prevalenza dei geni codificanti per le fimbrie e le tossine dei ceppi ETEC inclusi nello studio è riportata nella tabella 1. Le prevalenze di fimbrie e tossine non sono risultate significativamente differenti rispetto all'origine dei ceppi (Pearson $\chi^2(8) = 12.45$ $p > 0.05$ e Pearson $\chi^2(4) = 3.47$ $p > 0.05$, per fimbrie e tossine rispettivamente). In 48 casi sono stati isolati due ceppi ETEC nello stesso focolaio. In tutti i casi si trattava di ETEC con geni codificanti per antigeni fimbriali differenti e nel 75% dei casi i due ceppi isolati erano positivi rispettivamente per i geni codificanti per gli antigeni fimbriali F4 e F18.

Tabella 1. Prevalenza delle fimbrie e delle tossine di 543 ETEC isolati in focolai di PWD in Italia, Belgio-Olanda e Spagna tra gennaio 2015 e dicembre 2016

Table 1. Prevalence of examined genes for fimbriae and toxins of 543 ETEC strains isolated from PWD outbreaks in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain from January 2015 to December 2016.

n° di ceppi	Fimbrie					Tossine			
	F4	F18	F5	F6	F41	LT	STa	STb	Stx2e
Italia (n=168)	45.4 %	44.8 %	4.6 %	0.6 %	4.6 %	25.4 %	37.9 %	35.4 %	1.3 %
Belgio-Olanda (n=256)	52.3 %	40.3 %	2.3 %	0.8 %	4.3 %	22.2 %	37.7 %	38.9 %	1.2 %
Spagna (n=119)	45.8 %	44.2 %	1.7 %	4.2 %	4.1 %	31.1 %	34.1 %	34.5 %	0.3 %

In 9 casi, di cui 6 in Italia, 2 in Belgio-Olanda e 1 in Spagna, lo stesso ceppo possedeva più di un gene codificante per diversi antigeni fimbriali. In Italia: F5+F41 (1,8%) e F4+F18 (1,8%); in Belgio: F4+F18 (0,8%); in Spagna: F4+F6 (0,8%).

Come accennato in precedenza con il termine virotipo si intende la combinazione dei diversi fattori di virulenza che caratterizzano un ceppo all'interno del patotipo. Dall'analisi dei risultati della genotipizzazione condotta nel presente studio risulta che tra i 543 ceppi di ETEC inclusi nello studio sono stati individuati diversi virotipi: 28 nei 164 focolai descritti in Italia, 31 nei 216 casi in Belgio-Olanda e 20 nei 115 focolai in Spagna. Nella maggior parte dei casi un solo virotipo è stato osservato per ogni focolaio, tuttavia nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio.

In totale 12 ceppi di ETEC hanno presentato sia geni codificanti per almeno una enterotossina (STa, STb, LT) sia per la tossina Stx2e. In Italia il 2,5% dei focolai possedeva questo profilo "misto", in Belgio-Olanda il 2,4% e in Spagna lo 0,8%.

I 5 virotipi più frequenti riscontrati fra i ceppi ETEC isolati nei singoli paesi inclusi nello studio sono stati selezionati ed i dati ottenuti sono stati incrociati in tabella 2. Le prevalenze dei differenti virotipi sono risultate significativamente differenti tra le varie origini (Pearson $\chi^2(12) = 76.64$ $p < 0.001$).

Tabella 2. Virotipi prevalenti tra i 543 ETEC isolati in focolai di PWD in Italia, Belgio-Olanda e Spagna tra Gennaio 2015 e Dicembre 2016.

Table 2. Prevalent virotypes among 543 ETEC strains isolated from PWD outbreaks in Italy, Belgium-The Netherlands and Spain from January 2015 to December 2016.

Virotipi	Italia	Belgio-Olanda	Spagna
F18 STa	8.90%	5.08%	3.36%
F18 STa STb	17.90%	19.90%	10.10%
F18 STa STb LT	5.95%	4.30%	27.70%
F4 LT	8.93%	5.90%	4.20%
F4 STb LT	7.10%	6.30%	14.30%
F4 STa STb LT	17.86%	21.10%	12.60%
F4 STa STb	5.95%	13.70%	6.70%

Per quanto riguarda l'analisi dei ceppi ETEC isolati da casi di colibacillosi enterica in Italia, risulta che 37 dei 164 focolai analizzati hanno interessato 13 aziende, coinvolte da focolai ricorrenti di malattia. In 6 di queste (46,1%) sono stati isolati, da conferimenti di materiale patologico prelevato nel corso di focolai successivi, ETEC presentanti virotipi diversi. Andando ad eseguire la stessa valutazione sui 215 focolai occorsi in Belgio-Olanda, 74 di questi avevano interessato 17 aziende e in 10 di queste (58,8%) sono stati isolati virotipi diversi in successivi focolai. In tutti i casi in cui è stata rilevata la presenza di ceppi ETEC presentanti virotipi diversi in focolai successivi occorsi nella stessa azienda è stata osservata un'alternanza di ceppi aventi fimbrie F4 e F18.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente lavoro fornisce una panoramica sulla prevalenza dei virotipi di ceppi ETEC isolati da focolai di colibacillosi enterica in Italia, Belgio-Olanda e Spagna. Il primo risultato che dev'essere discusso riguarda il dato di prevalenza dei ceppi F4 e F18 che come noto sono i principali responsabili delle forme di colibacillosi che si verificano nel post svezzamento. I risultati ottenuti confermano, nei paesi coinvolti nello studio, l'importanza dei ceppi ETEC F4, che risultano essere i maggiori responsabili, in termini di prevalenza, dei casi di colibacillosi enterica. Tuttavia, gli ETEC F18 presentano livelli di prevalenza solo leggermente inferiori a quelli descritti per gli ETEC F4, confermando il ruolo fondamentale che questi hanno nell'epidemiologia della PWD. Questi risultati si trovano in accordo con un recente studio condotto a livello Europeo (Italia, Francia, Belgio-Olanda e Germania) nel periodo 2012-2014, dove la prevalenza delle fimbrie di ceppi ETEC isolati da casi di PWD risultava essere del 45,1% per F4 e del 33,9% per F18 (Luppi et al., 2016). Risultati simili sono stati riportati in indagini meno recenti eseguite in Danimarca (Frydendahl, 2002), Polonia (Osek et al., 2000) e Ungheria (Zajacova et al., 2012). In altri paesi come la Slovacchia (Vu Khac et al., 2006), invece, è stata segnalata una maggiore incidenza di ceppi F18.

Al di fuori dell'Europa esistono situazioni epidemiologiche differenti, tuttavia, in diverse aree geografiche è riportata una maggiore prevalenza di ceppi F18, come in Australia e Cuba (Smith et al., 2010; Blanco et al., 2006).

Il secondo risultato che merita una valutazione critica è legato all'isolamento di più ceppi di ETEC all'interno dello stesso focolaio. Nella maggior parte dei focolai di PWD un solo ceppo di ETEC è responsabile della problematica enterica e questo viene regolarmente isolato dai campioni patologici conferiti al laboratorio. Tuttavia, non è infrequente avere l'isolamento di più virotipi. I risultati del presente studio confermano quanto appena descritto, dove nel 2,4%, nel 18,5% e nel 3,5% dei casi, rispettivamente in Italia, Belgio-Olanda e Spagna, più di un virotipo era coinvolto nello stesso focolaio. Questo porta ad alcune considerazioni relative al campionamento di materiale patologico prelevato durante i focolai di colibacillosi. Per una diagnosi corretta, infatti è sempre buona norma conferire non meno di 3-5 campioni (feci, tamponi rettali, intestini, carcasse di suini) da cui eseguire l'isolamento e la successiva genotipizzazione del ceppo di *E.coli* isolato.

Il terzo aspetto che merita un approfondimento è relativo ai risultati ottenuti in allevamenti presentanti focolai ricorrenti di PWD da ETEC. In circa la metà di questi, sia in Italia, sia in Belgio-Olanda sono stati isolati nella stessa azienda virotipi di ETEC differenti, in tutti i casi con un'alternanza di ceppi presentanti fimbrie F4 e F18. Questo è probabilmente da ricondurre alle dinamiche eziopatogenetiche a cui è soggetta la malattia, sottolineando come i ceppi di ETEC siano normali componenti della flora intestinale del suino in equilibrio con le altre specie batteriche presenti. Moredo et al. hanno dimostrato la presenza di ETEC dalle feci di suini in assenza di diarrea in diverse fasi del processo produttivo: in suinetti sottoscrofa (16,6% degli animali), nel post svezzamento (66% degli animali) e nel periodo d'ingrasso (17,3% degli animali). Nel periodo post svezzamento il modificarsi dell'ambiente intestinale, per lo più

dovuto al cambio di alimentazione, porta ad un'alterazione della flora intestinale presente nel periodo pre-svezzamento. La presenza di fattori predisponenti (temperatura, stress, immunità dell'ospite, presenza degli specifici recettori per le fimbrie a livello della mucosa intestinale del suino etc.) può portare alla proliferazione di un ceppo o, in alcuni casi, di più ceppi di ETEC che colonizzano il piccolo intestino. In queste condizioni è quindi probabile che in focolai successivi di colibacillosi, in presenza di fattori predisponenti, possano prendere il sopravvento ceppi diversi e che questo possa essere modulato dai fattori predisponenti soprariportati.

Conoscere l'epidemiologia dei ceppi ETEC responsabili dei focolai di colibacillosi enterica in un allevamento, regione o nazione fornisce importanti elementi per un corretto approccio nella prevenzione e nella gestione della problematica sanitaria in allevamento.

Come descritto in numerosi lavori scientifici, la resistenza antimicrobica dei ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD è andata incrementandosi nel corso degli anni, in particolare nei confronti di numerose molecole antibiotiche come la colistina, l'apramicina, la neomicina, il trimethoprim+sulfametossazolo, fluorochinoloni e cefalosporine (Zhang et al., 2014; Luppi et al., 2015). Motivo di preoccupazione e fattore limitante da un punto di vista terapeutico è il dimostrato trend di incremento delle resistenze negli ETEC isolati da casi di PWD, nonché l'aumento di ceppi con resistenze antibiotiche multiple o multiresistenti. Questi aspetti, unitamente a misure che andranno a limitare nel prossimo futuro l'utilizzo di certe molecole chiave nel controllo della colibacillosi, come ad esempio la colistina o altri presidi come l'ossido di zinco, impongono un diverso approccio al problema che deve necessariamente passare da un'accurata diagnosi clinica, anatomopatologica e di laboratorio, comprendendo anche l'interpretazione dei risultati ottenuti in quest'ultimo. In questo contesto la valutazione della concentrazione di ETEC ottenuta in coltura e la successiva genotipizzazione per evidenziare i fattori di virulenza precedentemente descritti rivestono un ruolo diagnostico fondamentale. La conoscenza del virotipo responsabile di un focolaio di colibacillosi e l'eventuale variabilità dei ceppi isolati in corso di questi focolai in momenti diversi nella stessa azienda, come evidenziato in questo studio, permettono una corretta valutazione della problematica e forniscono informazioni per la scelta di appropriate misure di controllo e di prevenzione.

BIBLIOGRAFIA

Blanco M, Lazo L, Blanco JE, Dahbi G, Mora A, López C, González EA, Blanco J. (2006) Serotypes, virulence genes, and PFGE patterns of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from Cuban pigs with diarrhea. *Int Microbiol.* 1:53–60.

Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) “Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine”. *J Vet Diagn Invest.* (1):25-30.

Chen X., Gao S., Jiao X., Liu X.F. (2004) “Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea in eastern China”. *Vet Microbiol.* 103(1-2):13-20.

Fairbrother J.M., Gyles C.L. (2012) Colibacillosis in: Ziemmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. *Disease of Swine*. 10 ed. UK: Wiley-Blackwell pag. 723-47.

Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005) “*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies” *Anim Health Res Rev.* 6(1):17-39.

Frydendahl K. (2002) “Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches”. *Vet Microbiol.* 85(2):169-82.

Garabal J.I., Vázquez F., Blanco J., Blanco M., González E.A. (1997) “Colonization antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from piglets in Spain” *Vet Microbiol.* 54(3-4):321-8.

Kwon D., Choi C., Jung T., Chung H.K., Kim J.P., Bae S.S., Cho W.S., Kim J., Chae C. (2002) “Genotypic prevalence of the fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F41 and F18) and toxins (LT, STa, STb and Stx2e) in *Escherichia coli* isolated from postweaning pigs with diarrhoea or oedema disease in Korea”. *Vet Rec.* 150(2):35-7.

Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Gherpelli Y., Biasi G., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2015) “Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy” *Transbound Emerg Dis.* 62(1):67-71.

Luppi A., Gibellini M.V., Gin T., Vangroenweghe F., Vandebroucke V., Bauerfeind R., Binilauri P., Labarque G. and Hidalgo A. (2016) Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. *Porcine Health Management* 2:20. DOI 10.1186/s40813-016-0039-9

Osek J. (1999) Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning. *Vet Microbiol.* 68:209–17.

Rippinger P., Bertschinger H.U., Imberechts H., Nagy B., Sorg I., Stamm M., Wild P., Wittig W. (1995) “Designations F18ab and F18ac for the related fimbrial types F107, 2134P and 8813 of *Escherichia coli* isolated from porcine postweaning diarrhoea and from oedema disease”. *Vet Microbiol.* 45(4):281-95.

Smith MG, Jordan D, Chapman TA, Chin JJ, Barton MD, Do TN, Fahy VA, Fairbrother JM, Trott DJ. (2010) Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea. *Vet Microbiol.* 145:299–307.

Van Beers-Schreurs H.M., Vellenga L., Wensing T., Breukink H.J. (1992). “The pathogenesis of the post-weaning syndrome in weaned piglets: a review”. *Vet Q.* 14(1):29-34.

Vu Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Dahbi G., López C., González E.A., Blanco J. (2006) “Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia” *BMC Vet Res.* 2:10.

Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P. (2012) Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Vet Microbiol.* 154:369–75.

Zhang W. (2014) Progress and Challenges in Vaccine development against enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) – Associated porcine Post-weaning Diarrhea (PWD). *J. Vet. Med. Res.* 1 (2):1006.

**IMMUNOCRITO: UN NUOVO STRUMENTO PER LA
VALUTAZIONE DELLA CORRETTA COLOSTRATURA
(TRASFERIMENTO DELLE IMMUNOGLOBULINE MATERNE)
DEI SUINETTI**

***IMMUNOCRIT: A NEW TOOL TO EVALUATE COLOSTRUM INTAKE
(TRANSFER OF MATERNAL IMMUNOGLOBULINS)
IN ONE-DAY-OLD PIGLETS***

SANDRI G.⁽¹⁾, BRESAOLA M.⁽²⁾, GIOVANARDI D.⁽³⁾, PERINI F.⁽³⁾

⁽¹⁾Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi ⁽²⁾AIA, Gruppo Veronesi

⁽³⁾Laboratorio Tre Valli, Gruppo Veronesi

Parole Chiave: Immunocrito (IR), immunità materna, suinetti

Key words: Immunocrit Ratio (IR), maternal immunity, piglets

Riassunto

L'ingestione di colostro è un fattore essenziale per la sopravvivenza dei suinetti. E' sempre piuttosto difficile quantificare l'ingestione di colostro e il trasferimento di immunità passiva (immunoglobuline) dalla madre alla covata di suinetti. Recentemente è stato messo a punto un esame, da eseguire sul siero di sangue, che consente di valutare la quantità di immunoglobuline ingerite col colostro dai suinetti. Questo valore (quantità di immunoglobuline) si esprime con un rapporto IR (Immunocrit Ratio). Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare i valori di Immunocrito dal sangue di suinetti prelevati a 24 ore dalla nascita e valutare se esistesse una correlazione tra tali valori e altri parametri di allevamento quali peso dei suinetti alla nascita, dimensioni della covata, categoria di parto delle madri e mortalità sottoscrofa. Hanno partecipato allo studio 12 scrofaie. Sono stati prelevati 668 suinetti - provenienti da 112 madri diverse - suddivisi in base al peso alla nascita in piccoli, medi e grandi. I risultati mettono in evidenza come i valori medi di IR aumentino all'aumentare del peso alla nascita. Debole correlazione tra IR e dimensioni della covata. Risulta invece una correlazione positiva tra il valore IR medio di scrofaia e la diminuzione della mortalità media nel periodo sottoscrofa.

Abstract

Colostrum intake is an essential component for piglet survival. It is always quite difficult to assess colostrum intake and the transfer of passive immunity (immunoglobulins) from the mother to the litter. Recently a new test – to be performed on blood serum – has been made available to assess the amount of immunoglobulins ingested with colostrum. This value is expressed as a ratio (IR; Immunocrit Ratio) between the amount of Ig and the serum. The aim of this study was to determine the IRs of one-day-old piglets and evaluate the eventual correlation between such values and other production data such as piglet weight at birth, litter size, mother's parity and pre-weaning mortality. 12 sow herds took part in this study. 668 piglets, born from 112 different mothers, were assessed as lightweight, medium and heavy and then blood-sampled. Results underline how average IR values tend to increase as birthweight increases. A weak correlation was found with litter size while a positive correlation was found between the average sow-herd IR value and pre-weaning mortality.

INTRODUZIONE

L’assunzione di una sufficiente quantità di un buon colostro, ricco di immunoglobuline, da parte dei suinetti è una componente fondamentale per la protezione e sopravvivenza dei suinetti nelle prime settimane della loro vita. Una buona colostratura è il risultato di più fattori: la capacità intrinseca della scrofa di produrre un’ adeguata quantità di colostro, l’immunità aspecifica/specifica della scrofa stessa e l’abilità/possibilità dei suinetti di accedere alla mammella e quindi di assumere precocemente il colostro stesso. E’ sempre stato difficile valutare correttamente la quantità di colostro assunto dai suinetti e conseguentemente valutare il trasferimento di Immunoglobuline (Ig). Recentemente è stato proposto un nuovo metodo per misurare il trasferimento passivo di Immunoglobuline materne. Questo “strumento”, che si chiama Immunocrito, consiste in un valore (IR) che si determina per precipitazione delle Immunoglobuline presenti nel siero di sangue prelevato dai suinetti di un giorno di vita. In questo lavoro sono stati determinati i valori di immunocrito (IR) in suinetti di un giorno di vita provenienti da 12 scrofaie di un sistema produttivo per cercare di determinare/ stabilire un database di valori e vedere se e quali erano le correlazioni con i parametri produttivi.

MATERIALI E METODI

Le scrofaie coinvolte nella prova sono state 12. Le dimensioni di questi allevamenti variava tra le 900 e le 7.300 scrofe. La prova (raccolta campioni) si è svolta tra giugno e dicembre 2016. In ciascuna scrofaia venivano individuati parti che si concludevano naturalmente entro le ore 12.00. Idealmente tre scrofe al primo parto e sette pluripare. Nel corso del parto alle madri veniva prelevato un mix di colostro per la determinazione dei titoli anticorpali nei confronti di antigeni specifici (Aujeszky gB, PRRS, FLU). Dopo la registrazione del numero di nati (N.V., N.M., Mumm.), i suinetti di quei parti avevano naturalmente libero accesso al colostro ma non veniva consentito alcuno spostamento tra covate. Dopo circa 24 ore dalla conclusione dei parti – quindi entro le ore 12.00 del giorno successivo – si registrava nuovamente il numero di soggetti presenti e si procedeva al prelievo di sangue da sei suinetti: due piccoli (< 1kg), due medi (>1kg e <1,5kg), due grossi (> 1,5 kg). Il prelievo di circa 1 ml di sangue da ciascuno dei soggetti è stato effettuato dalla giugulare e/o vena cava utilizzando una siringa monouso (0,70x30mm – 22G x 1 1/4’). Il sangue refrigerato veniva poi inviato al Laboratorio Tre Valli per la determinazione del valore di Immunocrito (IR) secondo Vallet J.L, et al. (1). In sostanza - utilizzando una soluzione di ammonio solfato - le Immunoglobuline presenti nel siero vengono fatte precipitare all’interno di un tubo capillare. La lunghezza del precipitato formatasi all’interno del tubo ematocrito viene poi confrontata col siero residuo per determinare il rapporto (ImmunocritRatio) che viene espresso come numero decimale. Dagli stessi campioni di sangue dei suinetti sono stati determinati anche i valori sierologici per anticorpi Aujeszky gB, PRRS e Influenza. Questi ultimi valori sono stati utilizzati come benchmark nei confronti dei valori trovati nel colostro della madre al momento del parto. In totale sono stati prelevati e analizzati 668 sieri provenienti da suinetti di 112 covate. Al momento dei prelievi veniva annotata la categoria di parto della madre e la percentuale di mortalità sotto scrofa di quella particolare scrofaia nei cinque mesi precedenti.

RISULTATI

Abbastanza sorprendentemente i valori di IR rilevati nei suinetti figli delle primipare sono risultati leggermente più elevati (0,072) rispetto a quelli delle pluripare (0,067).

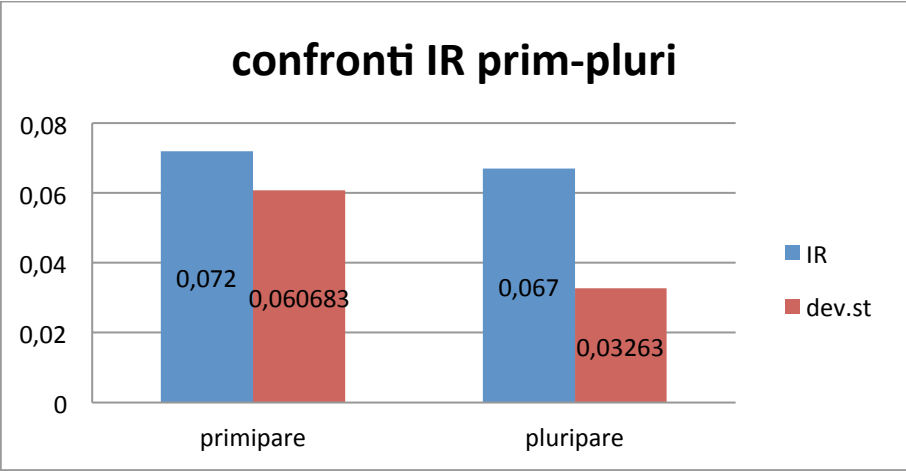


Grafico 1.

Altrettanto sorprendentemente non si è rilevata una forte correlazione tra i valori di IR e la dimensione delle covate (numero di suinetti Nati Vivi).

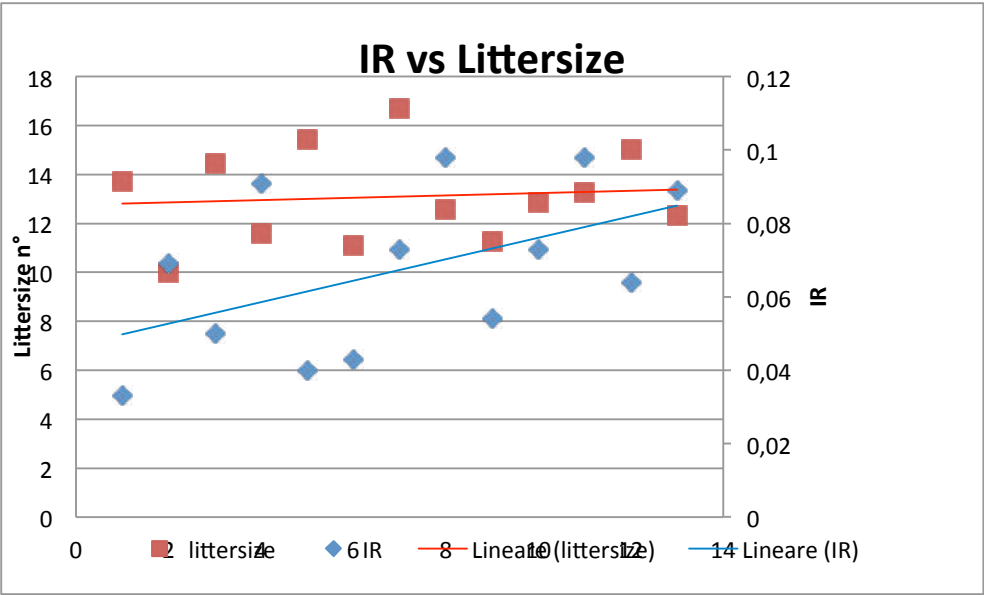


Grafico 2.

Anche se i dati non sono ancora stati sottoposti a indagine statistica, e quindi non se ne conosce la significatività, si nota come i valori di IR rilevati in covate di suinetti piccoli (0,059) siano inferiori a quelli delle covate di medi (0,067) che a loro volta sono inferiori a quelli dei suinetti più grandi (0,073).

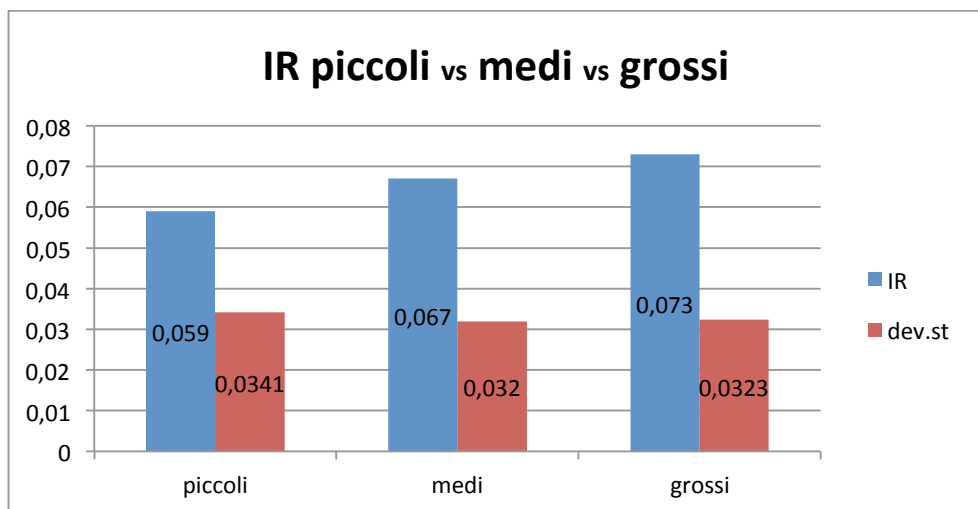


Grafico 3.

Sebbene anche questa non ancora confortata da studio statistico – e comunque con grande variabilità tra le aziende esaminate – sembra di intravedere una correlazione positiva tra il valore di Immunocrito (IR) e la diminuzione della mortalità in sala parto. Quest’ultima espressa come media della mortalità rilevata in ciascuna azienda nel mese del prelievo e nei quattro mesi precedenti.

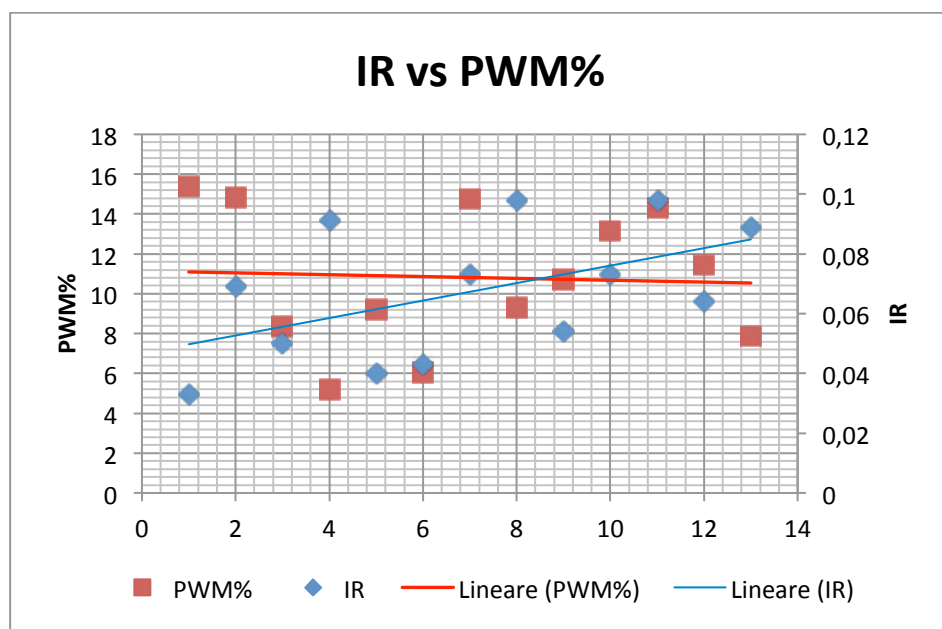


Grafico 4.

DISCUSSIONE

Purtroppo, a causa di difficoltà di tipo “logistico” (numero dei parti e momento del parto), in alcune scrofaie non è stato possibile prelevare lo stesso eguale numero di campioni e nemmeno rispettare esattamente il disegno dello studio che prevedeva di coinvolgere tre covate da primipare e sette da pluripare. I dati medi rilevati nelle dodici scrofaie oggetto dell’indagine sono risultati estremamente variabili (Min. 0,04; Max. 0,098; media 0,07; dev.st 0,020) evidenziando come la più grande fonte di variabilità risieda probabilmente nell’azienda/scrofaia stessa. Anche se sembra esserci una certa correlazione tra valori di IR elevato e riduzione della mortalità sottoscrofa, ci sono alcune contraddizioni apparenti come per esempio nel caso della scrofaia 5 che pur avendo un valore di mortalità sottoscrofa tra i più bassi (6,06%) aveva anche il secondo valore di IR più basso (0,043) tra quelli rilevati. Come ci si poteva aspettare i valori di IR aumentano all’aumentare del peso alla nascita dei suinetti lasciando intendere che i soggetti più grossi ingeriscano mediamente una maggior quantità di colostro e quindi di immunoglobuline. Anche se il dato medio di IR nelle covate figlie di primipare è risultato leggermente più elevato (ma sicuramente non statisticamente significativo) la variabilità dei valori tra i figli di primipare è risultata quasi doppia (Dev.st 0,060) di quella delle pluripare (Dev.st 0,032).

CONCLUSIONI

Una buona colostratura e il conseguente transfer di immunità sotto forma di immunoglobuline dalla madre ai suinetti è il risultato della interazione di molteplici fattori. Fondamentalmente si tratta dell’abilità intrinseca della scrofa di produrre e rilasciare un’abbondante quantità di colostro ma anche della capacità/possibilità dei suinetti di accedere al colostro materno e ingerirne una quantità “adeguata”. In questo equilibrio entrano in gioco fattori di tipo genetico (probabilmente), nutrizionale (corretta alimentazione della scrofa), strutturale (tipologia della gabbia parto) e gestionale (del parto e della colostratura). Dato il suo basso costo il valore di Immunocrito (IR) potrebbe essere uno strumento utile per determinare dei valori di riferimento (benchmark) da utilizzare in allevamento o all’interno di un sistema di produzione omogeneo al fine di mettere in atto, quando necessario, quelle misure necessarie per garantire a tutti suinetti nati l’ingestione di un’adeguata quantità di colostro.

BIBLIOGRAFIA

1. Vallet J.L., Miles J.R., Rempel L.A. (2012) – A simple novel measure of passive transfer of maternal immunoglobulin is predictive of preweaning mortality in piglets. The Veterinary Journal 2012 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.06.09>
2. Peters B.M., B.S., Krantz S.A., Holtkamp D.J., Wang C., Pantoja L.G. (2016) - Reference values for immunocrit ratios to assess maternal antibody uptake in 1-day-old piglets. JSHAP 2016, Vol.24 Number 1 :36-41
3. Balzani A., Cordell H.G., Edwards S.A. (2016) – Evaluation of an on farm method to assess colostrum IgG content in sows. Animal (2016) 10:4, (643-648)

IDENTIFICAZIONE DI NUOVI GENOTIPI EUROPEI DEL VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN ITALIA TRA IL 2013 E 2016

IDENTIFICATION OF NOVEL EUROPEAN SWINE INFLUENZA GENOTYPES IN ITALY BETWEEN 2013 AND 2016

FUSARO¹ A., ZAMPERIN¹ G., MILANI¹ A., SCHIVO¹ A., MONNE¹ I., CAVICCHIO¹ L., VIO¹ D., SCHIAVON¹ E., GIORGIUTTI² M., CASTELLAN² A., MION¹ M., BEATO¹ M.S.

¹Izsvé, viale dell'università 10, Legnaro 35020, Padova, Italy; ²Private Veterinary Consultants

Parole chiave: influenza suina, genotipi

Key words: swine influenza, genotypes, novel

Riassunto

La sorveglianza passiva condotta nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia tra il 2013 e il 2016 ha identificato un totale di sette allevamenti virologicamente positivi al virus dell'influenza suina (SIV), localizzati in nove differenti comuni di 4 diverse province. In alcuni allevamenti ripetuti focolai respiratori si sono registrati.

Il consorzio europeo per la sorveglianza di virus influenzali suini (European Surveillance Network for influenza in pigs – ESNIP) ha caratterizzato geneticamente i virus circolanti nei Paesi aderenti al consorzio tra 2009 e 2013, creando una classificazione univoca (Watson et al., 2015). In totale, a seguito della caratterizzazione di 290 virus, venticinque genotipi sono stati identificati e identificati da A a W.

Nel presente lavoro il genoma completo di 14 virus identificati tra il 2013 e il 2016 in Veneto e Friuli Venezia Giulia è stato caratterizzato mediante Illumina MiSeq, per identificare i genotipi circolanti nel suddetto territorio.

L'analisi filogenetica ha identificato due virus pandemici (A(H1N1)pdm09), 5 virus human-like H1N2 (H1_{hu}N2) e 5 avian-like H1N2 (H1_{av}N2), 1 avian-like H1N1 (H1_{av}N1) e 1 virus di sottotipo H3N2. In totale sono stati identificati 6 differenti genotipi, secondo la recente classificazione, tra cui 1 mai identificato e segnalato in Europa precedentemente.

La sorveglianza e l'identificazione dei genotipi circolanti consente di individuare la presenza di nuovi genotipi o l'introduzione di nuovi genotipi in Paesi e aree precedentemente indenni. Considerando il potenziale zoonotico di questi virus tale attività si dimostra necessaria per monitorare l'emergenza di virus con potenziale pandemico.

Abstract

Passive surveillance for Swine Influenza virus (SIV) in northeastern Italy (Veneto and Friuli Venezia Giulia regions) carried out between 2013 and 2016 identified a total of seven infected farms in nine different municipalities covering 4 neighbouring provinces. In some farms repeated respiratory outbreaks were observed over the investigated period.

Watson et al. (2015) have recently described 25 different SIV genotypes in Europe (A-W). To explore the genetic characteristic of the SIVs circulating in the area of investigation in Italy, we isolated and genetically characterized the complete genome of 14 viruses collected from seven different farms using the Illumina MiSeq.

Topology of the maximum likelihood phylogenetic trees identified two pandemic H1N1 (A(H1N1)pdm09), 5 human-like H1N2 (H1_{hu}N2) and 5 avian-like H1N2 (H1_{av}N2) subtypes, 1 avian-like H1N1 (H1_{av}N1) and 1 H3N2. A total of 6 different genotypes were identified according to the Watson's classification (2015). Interestingly, a novel genotype

which had never been identified in Europe before was detected and belonged to the H1N2 subtype.

Continued surveillance is necessary for detection of new or newly introduced genotypes that may pose a potential public health risk and therefore their persistence in pigs should be monitored closely.

INTRODUZIONE

L'influenza suina è una infezione respiratoria causata da virus appartenenti ai sottotipi H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1 pandemico. Tali sottotipi sono ulteriormente classificati in base al lineaggio genetico del gene dell'emoagglutinina (HA). Si identificano in tal modo virus Euroasian avian-like H1N1, human-like H1N2 e H1N1 di lineaggio pandemico. Un importante studio condotto dal consorzio Europeo "European Surveillance Network of Influenza in Pigs" (ESNIP) ha caratterizzato geneticamente l'intero genoma di 290 virus identificati tramite sorveglianza passiva e attiva in 14 Paesi Europei tra il 2009 e il 2013. La caratterizzazione genetica di questi virus ha consentito di stabilire una classificazione genetica univoca per i virus influenzali suini circolanti in Europa. Tale classificazione, indipendentemente dal sottotipo ha evidenziato l'esistenza di 25 genotipi (A-W) (Watson et al., 2015). Alcuni genotipi sono principalmente circolanti in alcuni Paesi come ad esempio il genotipo F (human-like H1N2) appare predominante in Italia, o il genotipo D (human-like H1N2) principalmente circolante in Danimarca.

Nel presente lavoro sono stati isolati e caratterizzati geneticamente 14 virus influenzali suini identificati attraverso sorveglianza passiva tra il 2013 e il 2016 nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia Giulia. I virus sono stati identificati in 7 diversi allevamenti distribuiti su un totale di 9 comuni e 4 province confinanti per le due regioni. Si riportano i dati dell'analisi filogenetica, tenendo conto della recente classificazione genetica, mostrano una alta diversità genetica e la circolazione di molteplici genotipi nelle due regioni oggetto di studio.

La caratterizzazione genetica ed eventualmente quella antigenica dei virus influenzali suini, consente di identificare i virus principalmente circolanti e di migliorare le attività di sorveglianza e controllo di questa importante infezione respiratoria.

MATERIALI E METODI

A seguito di sintomatologia respiratoria sono stati inviati all'Istituto Zooprofilattico delle Venezie, tamponi nasali di animali sintomatici. Per un singolo caso, a seguito di necropsia è stato inviato un polmone. I tamponi o organi sono stati processati mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo A, diretta verso il gene della proteina di matrice (M) (Hoffman et al., 2010). I campioni positivi sono stati tipizzati per identificare il gene HA e della neuraminidasi (NA) con una multiplex RT-PCR (Chiapponi et al., 2012). Tutti i campioni positivi mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo sono stati isolati mediante isolamento virale in colture cellulari.

I tamponi nasali sono stati stemperati in 2 ml di MEM (Sigma), contenente 0,5% di Albumina bovina e HEPES buffer e 1% di antibiotici e lasciati a 37°C overnight. Una aliquota è stata utilizzata per l'estrazione di RNA virale mediante kit commerciale (High Pure RNA Isolation Kit, Roche), e la rimanente parte è stata utilizzata per l'isolamento virale utilizzando un monostrato confluyente al 75% di cellule MDCK-SIAT trattate con l'1% di tripsina TPCK (WHO, 2002).

I virus isolati sono stati nuovamente caratterizzati mediante RT-PCR come sopra descritto e il loro intero genoma è stato sequenziato mediante Illumina MiSeq come precedentemente descritto (Monne et al., 2014).

L'analisi filogenetica è stata condotta, per ognuno degli otto geni di ciascun virus, generando degli alberi basati sul metodo della massima verosimiglianza (ML), utilizzando il

modello Best-fit general time reversible (GTR) per descrivere il tasso di sostituzione nucleotidica tra i siti con una distribuzione gamma dello stesso (con 4 gradi di variazione G_4) e l'algoritmo SPR sviluppato in PhyML (Guindon e Gascuel, 2003). La robustezza di ogni nodo dell'albero filogenetico è stata stabilita con valore bootstrap di 100 repliche.

RISULTATI

In totale sono stati identificati i seguenti virus: 2 virus appartenenti al lineaggio pandemico A(H1N1)pdm09, 5 virus human-like H1N2 (H1_{hu}N2), 5 virus avian-like H1N2 (H1_{av}N2), 1 avian-like H1N1 (H1_{av}N1) and 1 H3N2.

I 14 virus identificati appartengono a 6 differenti genotipi in base alla classificazione di Watson (Watson et al., 2015). Più precisamente i genotipi identificati, sono A, B, D, F, P e un genotipo, denominato "novel", non identificato precedentemente (Beato et al., 2016). Il genotipo P identifica i due virus di lineaggio interamente pandemico H1N1. I virus pandemici sono stati identificati in Friuli nel 2014 e in Veneto nel 2016.

Il genotipo F e Novel posseggono la stessa HA (Human-like) e sono entrambi virus di sierotipo H1N2. I virus del genotipo A e D, posseggono la stessa HA (avian-like) ma NA differenti, rispettivamente N1 e N2. Il virus di genotipo B invece appartiene al sierotipo H3N2.

Due virus del genotipo F human-like H1N2, sono stati identificati in Veneto nelle provincia di Verona nel 2015. Cinque virus appartenenti al genotipo D, sono stati identificati dal 2013 al 2015 nelle province di Padova, Treviso e Pordenone. L'unico virus del genotipo A, avian-like H1N1 (H1_{av}N1) è stato identificato nella provincia di Udine nel 2014. Il genotipo B, H3N2, è stato identificato nelle provincia di Padova nel 2014. Il genotipo Novel avian-like H1N2 (H1_{av}N2) è stato invece identificato in una sola provincia nel 2013 e 2014. Questo genotipo si distingue dal genotipo F in quanto ha acquisito il gene M da virus pandemici, ed è l'unico genotipo non appartenente al lineaggio pandemico, tra quelli identificati nel quale si è osservato questo tipo di riassortimento.

DISCUSSIONI

La presenza del genotipo F in Italia è stata già descritta sin dal 2003 (Moreno et al., 2013; Watson et al., 2015), e i dati generati confermano che tale genotipo continua a circolare nel nostro Paese, sebbene nel periodo di studio la sua presenza sia stata identificata nelle province di Verona e Padova.

Molteplici invece sono state le identificazioni del genotipo D, avian-like H1N2 (H1_{av}N2), ovvero in 3 province Padova, Pordenone e Treviso nel 2013, 2015 e 2016. La circolazione del genotipo D è stata principalmente segnalata in Danimarca (Watson et al., 2015). Le relazioni commerciali nel settore suinicolo tra Italia e Danimarca potrebbero far ipotizzare una introduzione del genotipo attraverso questa modalità, ma non è possibile stabilire se i casi individuati siano nuove introduzioni o se il genotipo D è stato introdotto precedentemente nel Nord-Est Italia e solo ora identificato e quindi segnalato.

Il genotipo Novel, fino ad ora è stato segnalato solo in Italia e la sua circolazione è stata identificata in un solo allevamento a ciclo aperto nella provincia di Treviso tra il 2013 e 2014. Tale genotipo ha una interessante caratteristica ovvero quella di aver acquisito il gene M dal virus pandemico A(H1N1)pdm09. Tale simile fenomeno è stato anche osservato per i genotipi M e N rispettivamente H1_{av}N1 e H3N2 (Watson et al. 2015), in China (genotipo) (Sw/HK/NS2378/12-like) (Liang et al. 2014), ma anche in America identificato come H3N2variante (A(H3N2)v) in grado di infettare l'uomo (Wong et al. 2012; Nelson et al. 2012; Kitikoon et al. 2012).

L'acquisizione del gene M è stata associata inoltre ad una aumentata capacità di trasmissione dei virus influenzali suini in furetto (Lakdawala et al. 2011) e criceto (Chou et al. 2011).

CONCLUSIONI

Lo studio del genoma completo dei virus influenzali suini identificati tramite sorveglianza passiva in Nord-Est Italia tra il 2013 e il 2016 ha permesso di generare dei dati preliminari sui genotipi circolanti. La diversità di genotipo identificati (6) dimostra la variabilità dei virus influenzali e la necessità di una continua sorveglianza e caratterizzazione. Mancanti sono ancora i dati sulle caratteristiche antigeniche di tali virus e sulle correlazioni antigeniche tra questi e i vaccini disponibili. Inoltre sono assenti dati sulla virulenza di questi genotipi e sulla diversa capacità di trasmissione degli stessi.

Una sorveglianza attiva con campionamenti longitudinali intra allevamento consentirebbe sicuramente di acquisire maggiori dati che consentirebbero di formulare ipotesi più precise sulla dinamica di introduzione, infezione e riassortimento e in particolar modo consentirebbero di mappare in maniera più precisa la circolazione dei genotipi.

La sorveglianza delle sindromi respiratorie nel suino è di primaria importanza al fine di identificare la circolazione di virus con potenziale zoonosico o con caratteristiche tali.

BIBLIOGRAFIA

- Chiapponi C., Moreno A., Barbieri I., Merenda M., Foni E., (2012) “Multiplex RT-PCR assay for differentiating European swine influenza virus subtypes H1N1, H1N2 and H3N2”. *J Virol Methods* 184, 117-120.
- Chou Y.Y., Albrecht R.A., Pica N., Lowen A.C., Richt J.A., Garcia-Sastre A., Palese P., Hai R., (2011) “The M segment of the 2009 new pandemic H1N1 influenza virus is critical for its high transmission efficiency in the guinea pig model”. *J Virol* 85, 11235-11241.
- Guindon S., Gascuel O., (2003) “A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood”. *Syst Biol* 52, 696-704.
- Hoffmann B., Harder T., Lange E., Kalthoff D., Reimann I., Grund C., Oehme R., Vahlenkamp T.W., Beer M., (2010) “New real-time reverse transcriptase polymerase chain reactions facilitate detection and differentiation of novel A/H1N1 influenza virus in porcine and human samples”. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 123, 286-292.
- Kitikoon P., Vincent A.L., Gauger P.C., Schlink S.N., Bayles D.O., Gramer M.R., Darnell D., Webby R.J., Lager K.M., Swenson S.L., Klimov A., (2012) “Pathogenicity and transmission in pigs of the novel A(H3N2)v influenza virus isolated from humans and characterization of swine H3N2 viruses isolated in 2010-2011”. *J Virol* 86, 6804-6814.
- Lakdawala S.S., Lamirande E.W., Suguitan A.L., Jr, Wang W., Santos C.P., Vogel L., Matsuoka Y., Lindsley W.G., Jin H., Subbarao K., (2011) “Eurasian-origin gene segments contribute to the transmissibility, aerosol release, and morphology of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus”. *PLoS Pathog* 7, e1002443.
- Liang H., Lam T.T., Fan X., Chen X., Zeng Y., Zhou J., Duan L., Tse M., Chan C.H., Li L., Leung T.Y., Yip C.H., Cheung C.L., Zhou B., Smith D.K., Poon L.L., Peiris M., Guan Y., Zhu H., (2014) “Expansion of genotypic diversity and establishment of 2009 H1N1 pandemic-origin internal genes in pigs in China”. *J Virol* 88, 10864-10874.
- Monne I., Fusaro A., Nelson M.I., Bonfanti L., Mulatti P., Hughes J., Murcia P.R., Schivo A., Valastro V., Moreno A., Holmes E.C., Cattoli G., (2014) Emergence of a highly pathogenic avian influenza virus from a low-pathogenic progenitor”. *J Virol* 88, 4375-4388.
- Moreno A., Gabanelli E., Sozzi E., Lelli D., Chiapponi C., Ciccozzi M., Zehender G., Cordioli P., (2013) “Different evolutionary trends of swine H1N2 influenza viruses in Italy compared to European viruses” *Vet Res* 44, 112-9716-44-112.

- Nelson M.I., Vincent A.L., Kitikoon P., Holmes E.C., Gramer M.R., (2012) “Evolution of novel reassortant A/H3N2 influenza viruses in North American swine and humans, 2009-2011”. *J Virol* 86, 8872-8878.
- Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T., Cotten M., Kelly M., Van Reeth K., Qiu Y., Simon G., Bonin E., Foni E., Chiapponi C., Larsen L., Hjulsgager C., Markowska-Daniel I., Urbaniak K., Durrwald R., Schlegel M., Huovilainen A., Davidson I., Dan A., Loeffen W., Edwards S., Bublot M., Vila T., Maldonado J., Valls L., ESNIP3 Consortium, Brown I.H., Pybus O.G., Kellam P. (2015) “Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013.” *J Virol* 89, 9920-9931.
- WHO, 2002. Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5 Rev. 1.
- Wong K.K., Greenbaum A., Moll M.E., Lando J., Moore E.L., Ganatra R., Biggerstaff M., Lam E., Smith E.E., Storms A.D., Miller J.R., Dato V., Nalluswami K., Nambiar A., Silvestri S.A., Lute J.R., Ostroff S., Hancock K., Branch A., Trock, S.C., Klimov A., Shu B., Brammer L., Epperson S., Finelli L., Jhung, M.A. (2012) “Outbreak of influenza A (H3N2) variant virus infection among attendees of an agricultural fair, Pennsylvania, USA, 2011”. *Emerg Infect Dis* 18, 1937-1944.

CASI CLINICI

IMPORTANZA DEL BILANCIO ELETTROLITICO DEB DELLA SCROFA DURANTE LA LATTAZIONE

BRESAOLA M.^[1], VINCENZI R.^[2], GIOVANARDI D.^[3], PERINI F.^[3], SANDRI G.^[2]

^[1] AIA, Gruppo Veronesi ^[2] Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi ^[3] Laboratorio Tre Valli, Gruppo Veronesi

INTRODUZIONE

Nel seguente caso clinico verrà discussa l'importanza del bilancio elettrolitico (DEB) dell'alimento della scrofa durante la lattazione.

I programmi di selezione genetica delle scrofe hanno portato negli anni ad un continuo aumento del numero di suinetti nati vivi. Affinché tutti questi suinetti possano raggiungere lo svezzamento è necessario che la lattazione avvenga senza problemi. Ne consegue che la produzione di latte da parte della scrofa assume oggi un ruolo ancora più importante rispetto al passato.

Descrizione del caso

Anamnesi

In un allevamento di circa 3.000 scrofe (sito 1) localizzato nella Pianura Padana, nel Gennaio del 2015 si iniziò a rimontare la mandria con una genetica più prolifica. Con l'entrata in produzione della nuova genetica si assistette ad:

- aumento della mortalità dei suinetti in sala parto, media da Giugno 2015 a Maggio 2016 superiore al 15%
- una riduzione del peso dei suinetti allo svezzamento, media da Giugno 2015 a Maggio 2016 inferiore a 6 Kg/suinetto a 26 giorni di lattazione (suinetti svezzati scrofa 10,6)

Segni Clinici

A Maggio 2016 la situazione in sala parto si presentava come segue:

- Al parto i suinetti si mostravano in buone condizioni di salute, con buona vitalità e alla vista di un peso soddisfacente.
- Nei giorni successivi al parto, dal giorno 1 al giorno 7 di vita, si assisteva ad un costante e progressivo deperimento dei suinetti, i cui esiti principali erano un incremento della mortalità sottoscrofa ed un ritardo di crescita. Durante questa fase di deperimento i suinetti non mostravano sintomi di tipo respiratorio, e solamente alcune covate (sia di scrofe che di scrofette) manifestavano fenomeni enterici (diarrea)
- Dal giorno 7 al giorno dello svezzamento i suinetti recuperavano un buono stato di salute, compensando in parte il ritardo di crescita accumulato nella prima settimana di vita.

Diagnosi differenziale

Furono ipotizzate le seguenti diagnosi differenziali:

- Problematiche di natura enterica dei suinetti
- Problematiche di natura virale con particolare riferimento a circolazione di PRRSv
- Problematiche di colostratura dei suinetti
- Problematiche di agalassia/disordini metabolici delle scrofe

Risultati di laboratorio

Problematiche di natura enterica

Benché il quadro enterico non fosse particolarmente grave si decise di approfondire tale aspetto con l'invio al laboratorio di campioni di feci e di suinetti sottoscrofa particolarmente deperiti.

- In data 08/06/2016 furono inviati al laboratorio 6 suinetti, nei quali fu isolato Clostridium perfringens tipo A gene cpb2. In tutti i campioni la carica di Cl. Perfringens era inferiore a 1 milione di U.F.C
- In data 08/06/2016 e 04/07/2016 furono inviati al laboratorio campioni di feci di suinetti con diarrea, in entrambi in casi fu isolato E.coli K88 negativo e Clostridium perfringens tipo A.

Problematiche di natura infettiva/virale

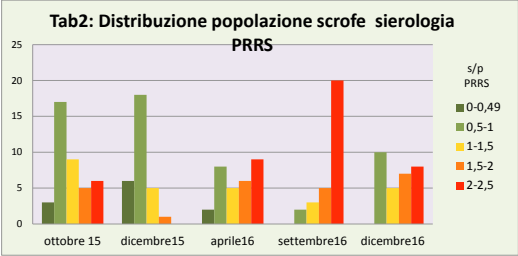
Da precedenti monitoraggi sierologici l’azienda risultava essere PRRSv stabile così come definito da American Association of Swine Veterinarians (Holtkamp DJ et al., 2011)

Si decise di continuare il monitoraggio virologico/sierologico per PRRSv e altri patogeni sia nei suinetti che nelle scrofe. In Tab.1 vengono riassunti gli esiti degli esami dei suinetti mentre in Tab.2 sono riportate le classi di distribuzione delle scrofe in base a s/p PRRSv.

Da Maggio 2016 a oggi l’azienda può definirsi stabile per PRRSv.

Tab1: prelievi allo svezzamento

DATA PRELIEVO	Rdp	N° CAMPIONI	SIEROLOGIA											PCR
			APP2		APP 1-9-11		Flu			PRRS				PCR PRRS
			+	-	+	-	+	-	S/P	+	-	% pos	S/P	6 POOL
25/05/16	Esame -16-14562.PDF	30 MASCHI	0	30	0	30	29	1	1,82	24	6	80%	0,90	Neg
22/06/16	Esame -16-17584.PDF	30 MASCHI	0	30	0	30				28	2	93%	1,16	Neg
15/09/16	Esame -16-25664.PDF	30 MASCHI	0	30	0	30				21	9	70%	0,84	Neg
24/11/16	Esame -16-32292.PDF	30 MASCHI	0	30	0	30	28	2	1,15	23	7	77%	0,99	Neg
18/01/16		30 MASCHI	0	30	0	30				24	6	80%	1,37	Neg



Problematiche di colostratura dei suinetti

Al fine di valutare la colostratura dei suinetti si decise di utilizzare “Ig immunocrit ratio” (IR) secondo quanto proposto da Vallet JL et al.,2013.

Il 12/07/2016 fu valutato l’IR di 42 suinetti, 6 per nidiata (3 scrofette e 4 pluripare). I prelievi di sangue furono eseguiti a circa 24 ore di vita dei suinetti. Di seguito in Tab.3 sono riportati i risultati dei prelievi. In un lavoro del 2016 in cui furono campionati 779 suinetti a 24 ore di vita in 9 differenti scrofaie situate in USA fu determinato un IR medio di 0,098 ± 0,026 SD (Peters BM et al., 2016), circa 3 volte superiore a quanto rilevato nei 42 suinetti campionati.

Tab.3 immunocrito suinetti

	12/07/2016	
	IR	± SD
MEDIA TOTALE SUINETTI	0,033	0,0177
MEDIA SUINETTI PRIMIPARE	0,021	0,0126
MEDIA SUINETTI PLURIPARE	0,038	0,0175
MEDIA SUINETTI "G" >1,5 Kg	0,039	0,0202
MEDIA SUINETTI "M"	0,032	0,0174
MEDIA SUINETTI "P" <1,0 Kg	0,027	0,0140

Problematiche di agalassia/disordini metabolici delle scrofe

Come indicato da DeRouchey et al 2003, si decise di investigare il pH delle urine delle scrofe in sala parto, al fine di utilizzare tale parametro come marker indiretto del pH del sangue. Il 28/05/2016, durante il primo pasto del mattino, venne rilevato il pH delle urine di 52 scrofe presenti in sala parto, mediante l’utilizzo di cartine tornasole. In Tab.4 sono riportati i risultati delle misurazioni.

Tab.4 pH urine scrofe sala parto

Categoria scrofe	25/02/216		
	n° di scrofe	PH urine	± SD
prima del parto	4	7,63	0,479
da 0 a 7 giorni post partum	18	8,11	0,676
da 8 a 14 giorni post partum	15	8,10	0,687
da 15 a 21 giorni post partum	8	7,69	0,704
oltre 22 giorni post partum	7	7,43	1,134

Diagnosi e terapia

Le indagini di laboratorio condotte permisero di escludere nei suinetti sottoscrofa problematiche di natura infettiva, riferibili a infezioni da PRRSv. L’isolamento di E.coli e Clostridium perfringens tipo A fu ritenuto una complicazione di natura secondaria.

Considerando gli esiti dell’esame dell’immunocrito, si individuò nella cattiva colostratura dei suinetti una delle principali cause della mortalità pre-svezzamento. A tal riguardo si decise dal 15/07/2016 di aumentare la presenza di personale e di utilizzare l’allattamento frazionato (split-suckling) nei primi giorni di vita.

In riferimento al pH delle urine delle scrofe si decise di intervenire nel ridurre il bilancio elettrolitico (DEB) dell’alimento in sala parto. Mediante la somministrazione in mangiatoia (top-dressing) di 20 grammi di Cloruro di Calcio, a partire dal 10/06/2016, fu ridotto il DEB da 150 mEq/Kg a 95 mEq/Kg. Tale intervento determinò una riduzione del pH del sangue delle scrofe, aumentando di conseguenza la quota di Calcio libero ionizzato.

Decorso clinico

- L’utilizzo dell’allattamento frazionato e la maggior presenza di personale in sala parto determinò una migliore colostratura dei suinetti. Il 15/09/2016 venne ripetuto l’esame dell’immunocrito a 24h di vita, ed in tutte le categorie di suinetti venne riscontrato un aumento dell’IR rispetto al prelievo precedente (Tab.5)

Tab.5 immunocrito suinetti

	12/07/2016		15/09/2016	
	IR	± SD	IR	± SD
MEDIA TOTALE SUINETTI	0,033	0,0177	0,050	0,0125
MEDIA SUINETTI PRIMIPARE	0,021	0,0126	0,049	0,0151
MEDIA SUINETTI PLURIPARE	0,038	0,0175	0,052	0,0151
MEDIA SUINETTI "G" >1,5 Kg	0,039	0,0202	0,057	0,0079
MEDIA SUINETTI "M"	0,032	0,0174	0,046	0,0127
MEDIA SUINETTI "P" <1,0 Kg	0,027	0,0140	0,056	0,0133

- L'utilizzo di Cloruro di Calcio comportò una riduzione del pH delle urine. In data 07/07/2016 e 17/08/2016 venne rilevato il pH delle urine in sala parto e venne riscontrato una diminuzione del pH stesso (Tab.6).

Tab.6 pH urine scrofe sala parto

	25/02/216			07/07/2016			17/08/2017		
Categoria scrofe	n° di scrofe	PH urine	± SD	n° di scrofe	PH urine	± SD	n° di scrofe	PH urine	± SD
prima del parto	4	7,63	0,479	4	6,12	0,629	6	6,25	0,274
da 0 a 7 giorni post partum	18	8,11	0,676	7	6,21	0,393	5	6,2	0,447
da 8 a 14 giorni post partum	15	8,10	0,687						
da 15 a 21 giorni post partum	8	7,69	0,704						
oltre 22 giorni post partum	7	7,43	1,134						

- L'allattamento frazionato, la maggior presenza di personale in sala parto e l'utilizzo di Cloruro di Calcio per ridurre il DEB dell'alimento utilizzato, consentirono di ridurre in maniera significativa il numero della covate in cui i suinetti manifestavano un grave deperimento nei primi sette giorni di vita. Ne conseguì una **riduzione della mortalità pre-svezzamento** (media da Luglio 2016 a Dicembre 2016 di 10,5%) e un **aumento del peso allo svezzamento** (media da Luglio 2016 a Dicembre 2016 di 6,5 Kg/suinetto a 26 giorni di lattazione)

DISCUSSIONE

Grazie alla selezione genetica l'obiettivo di svezzare 12 suinetti scrofa per molti allevamenti è ormai un traguardo raggiungibile. È evidente che per portare allo svezzamento 12 suinetti una scrofa deve garantire un'adequata produzione di latte. Questo aspetto produttivo è stato per molto tempo poco considerato, in particolare se si confronta la scrofa con la bovina da latte. Come per la vacca anche per la scrofa la parte più delicata della lattazione è il suo inizio, ed una buona montata lattea nelle fasi iniziali è garanzia di un buon risultato produttivo.

Da un punto di vista dell'alimentazione negli ultimi anni l'interesse dei nutrizionisti si è rivolto in particolare al bilancio elettrolitico dell'alimento (DEB). Il DEB, ovvero il bilancio di cationi e anioni della dieta, si esprime in milliequivalenti (mEq/Kg) ed è il risultato della seguente formula:

$$DEB= \frac{Na \text{ (g/Kg)} \times 1000}{23} + \frac{K \text{ (g/Kg)} \times 1000}{39} - \frac{Cl \text{ (g/Kg)} \times 1000}{39,5}$$

Il DEB permette di conoscere come risponderà da un punto di vista acido/base una scrofa ad una determinata dieta. Uno studio di DeRouchey et al 2003, dimostrò come il DEB fosse in grado di influenzare il pH del sangue, e come la solubilità del Calcio libero ionizzato nel sangue fosse strettamente legata al pH del sangue stesso.

DEB (mEq/Kg)	0	100	200	350	500
Sangue					
pH	7,33	7,36	7,39	7,41	7,43
Ca (mg/dl)	5,5	5,3	5,2	5,1	5,0
Urine					
pH	4,87	5,01	6,64	7,00	7,7

La produzione di colostro prima e di latte dopo è strettamente influenzata dalla quantità di Ca libero ionizzato presente nel sangue. Ne consegue che attraverso l'alimento è possibile indurre una riduzione del pH del sangue, aumentare la quota di Ca solubile e quindi favorire la produzione di latte, in particolar modo nelle fasi iniziali della lattazione. Nella pratica si utilizza il pH delle urine come marker indiretto del pH del sangue.

Nel presente caso clinico si è deciso di ridurre il DEB dell'alimento mediate l'utilizzo di Cloruro di Calcio, da somministrare top-dressing ad ogni singola scrofa durante la lattazione. Tale accorgimento, assieme allo split-suckling, ha consentito di migliorare la colostratura dei suinetti e aumentare la produzione di latte da parte delle scrofe nei primi giorni immediatamente successivi al parto.

Per valutare la colostratura si è utilizzato “Ig immunocrit ratio” (IR). Si tratta di un metodo relativamente rapido ed economico, che consente di stimare la velocità di interazione fra suinetto e scrofa dopo il parto e di valutare la bontà del colostro della scrofa. Questo caso clinico dimostra come l'aumento delle prolificità delle attuali scrofe allevate non sempre si accompagni con un aumento del numero di suinetti svezzati. Tali scrofe richiedono infatti una maggior attenzione per quel che riguarda tutti gli aspetti che interferiscono con la loro carriera produttiva. L'alimentazione, intesa nella sua accezione più ampia, riveste un ruolo di primaria importanza.

BIBLIOGRAFIA

- Holtkamp DJ, Polson DD, Torremorell M, Morrison B, Classen DM, Becton L, Henry S, Rodibaugh MT, Rowland RR, Snelson H, Straw B, Yeske P, Zimmerman J; American Association of Swine Veterinarians; United States Department of Agriculture PRRS-Coordinated Agricultural Projec
- Vallet JL, Miles JR, Rempel LA; A simple novel measure of passive transfer of maternal immunoglobulin is predictive of preweaning mortality in piglets Vet J. 2013 Jan;195(1):91-7
- Peters BM, Krantz SA, Holtkamp DJ, et al. Reference values for immunocrit ratios to assess maternal antibody uptake in 1-day-old piglets. J Swine Health Prod. 2016; 24(1):36–41.
- DeRouchey, J. M., J. D. Hancock, R. H. Hines, K. R. Cummings, D. J. Lee, C. A. Maloney, D. W. Dean, J. S. Park, and H. Cao. Effects of dietary electrolyte balance on the chemistry of blood and urine in lactating sows and sow litter performance12. Journal of Animal Science 2003; 81:3067-3074.

EFFICACIA DI UN VACCINO INATTIVATO BIVALENTE CONTRO CL. DIFFICILE E CL. PERFRINGENS DI TIPO A

NIGRELLI A.D.¹, LOMBARDI G.¹, FACCINI S.¹, CALEFFI A.², BARDINI R.²,
FRANZINI G.¹, ROSIGNOLI C.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

² Veterinario LP

INTRODUZIONE

Lo scopo del report è la descrizione di due episodi di enterite enzootica da *Clostridium difficile*, in un caso associato a *Clostridium perfringens* tipo A, e descrivere l'efficacia di un vaccino inattivato stabulogeno bivalente contro Cl. difficile e Cl. perfringens tipo A in questo episodio. Le enteriti enzootiche neonatali sono sostenute da diversi agenti batterici, virali e parassitari, spesso associati fra loro, di cui i più rappresentativi sono E.coli enterotossici (ETEC), Cl. perfringens tipo A e C, Rotavirus, Coronavirus e Coccidi.

Cl. difficile produce una enterocolite, agendo a livello del colon mediante tre tossine A, B e una terza tossina binaria (CDT).

Nello sviluppo delle patologie sono importanti: carica infettante (scarsa igiene), tossigenicità ed entero adesività del ceppo, immunità passiva dei suinetti e, secondo alcuni autori (Martineau, 2007), eccessivo utilizzo di antibiotici, che riducono la flora competitiva.

Cl. perfringens tipo A produce infiammazione e perdita di liquido a livello del piccolo intestino, per l'azione delle tossine Alfa e Beta₂, anche se non è chiaro il ruolo di quest'ultima.

DESCRIZIONE DEL CASO

Allevamento 1: Sito 1 di n. 500 scrofe la cui produzione è al 50% di 7 kg pv e l'altro 50% di lattoni di 25-28 kg pv.

A distanza di un po' di tempo da un severo episodio di PED, si è manifestata una diarrea giallo-biancastra nei primi 2 – 4 giorni di vita, con morbidità superiore a 80% nelle nidiate delle scrofe primipare e del 30% in quelle delle scrofe pluripare: le nidiate colpite venivano a morte completamente.

L'esame necroscopico evidenziava un'enterocolite ed edema al muscolo in quasi tutti i soggetti analizzati, in una parte dei soggetti si associava un'infiammazione del piccolo intestino con aumento del contenuto da pastoso ad acquoso ma non emorragico. L'ileo si presentava, in alcuni casi, dilatato.

Le ricerche di laboratorio evidenziavano, dal colon di tutti i soggetti, sia la presenza delle tossine A e B, mediante test Elisa, che l'isolamento di Cl. difficile in coltura; nei soggetti con interessamento del piccolo intestino si isolava, in quantità superiore a 100.000 UFC/ml, Cl. perfringens che una PCR Multiplex identificava come produttore di tossine Alfa e Beta₂, quindi di tipo A.

Le analisi per ETEC, Rotavirus, Coronavirus e Coccidi, davano esito negativo, come pure le ricerche per altri agenti virali, tramite Microscopia Elettronica.

Nonostante i trattamenti, sia in metafilassi che in terapia con macrolidi ai suinetti e alle scrofe, la situazione è persistita per alcuni mesi: l'allevatore aveva considerato di interrompere il ciclo produttivo.

E' stato, quindi, allestito un vaccino bivalente stabulogeno inattivato contenente corpi batterici e tossoidi A e B del Cl. difficile e tossoide Alfa di Cl. perfringens, adiuvato a idrossido di alluminio. Il piano di vaccinazione ha previsto due interventi a 40 e 20 giorni prima del parto, ovviamente nelle scrofe in gestazione avanzata era possibile una sola vaccinazione eseguita almeno 20 giorni prima del parto.

Già nelle nidiate nate dalle scrofe vaccinate una sola volta, le perdite diminuivano considerevol-

mente, fino ad ottenere la scomparsa della patologia nelle nidiatae nate da scrofe vaccinate due volte.

Allevamento 2: Sito di 600 scrofe per la produzione di lattoni in cui si evidenziava, entro la prima settimana di vita ed in circa il 25% dei suinetti, una sindrome con deperimento e mortalità in tutti i soggetti colpiti, con scarsissima evidenza di diarrea.

La patologia si manifestava in circa il 50% delle nidiatae, nell'ambito delle quali la mortalità era del 50%.

Alla necropsia si osservava una enterocolite ed edema al mesocolon.

L'anamnesi non parlava di una pressione antibiotica elevata.

Le ricerche batteriologiche evidenziavano la presenza di *Cl. difficile* e delle tossine A e B, tramite Elisa.

Nessun altro patogeno enterico era rilevato.

I soggetti erano trattati per OS alla nascita e con tilosina.

La sintomatologia si riduceva in modo più che soddisfacente.

DISCUSSIONE

I due casi riportati dimostrano che *Cl. difficile*, sia pure non frequentemente può essere agente primario (solo o associato a *Cl. perfringens*), dell'enterite enzootica nel suinetto anche in assenza di una importante pressione antibiotica come, invece, avviene generalmente nell'uomo (Bartlett, 2002).

L'utilizzo di vaccino stabulogeno si è rilevato uno strumento di prevenzione importante, laddove il trattamento con macrolidi non ha determinato risultati soddisfacenti.

BIBLIOGRAFIA

Martineau S.P., Thomas G., Morvare H., Gherpelli M. (2006) - Le Diarree neonatali enzootiche in allevamenti: si dovrà prendere in considerazione l'ipotesi nosocomiale?

Atti della Giornata di Studio SIPAS "Attualità in tema di enteriti del suino: dalla sala parto all'ingrasso, dai Coli a Coronavirus"

Salsomaggiore Terme 6 ottobre 2006, 69 – 75

Bartlett J.C. (2002) – Antibiotic associated diarrhea – M. Engl. J. Ned, 346, 334 -339.

Rosignoli C. (2013) – Le Clostridiosi, 423 – 439, in Mantelli P. "Le Patologie del maiale" 1ª ed., Milano, Le Point Vétérinaire p. 423 – 439.



Edema al mesocolon da *Cl. difficile*.

ZOPPIE IN ANIMALI IN MAGRONAGGIO E INGRASSO DOVUTE A INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOSYNOVIAE*

USTULIN M.¹, MORONATO M.L.², GIORGIUTTI M.³, CATANIA S.², GOBBO F.², VIO D.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone;

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare;

³ Libero professionista, Pagnacco (UD)

INTRODUZIONE

Il presente report descrive un caso clinico relativo a zoppie diffuse in animali in magronaggio in un allevamento a ciclo chiuso causate da infezione da *Mycoplasma hyosynoviae* (*M. hyosynoviae*).

L'infezione articolare da *M. hyosynoviae* è riconosciuta come causa di artriti non purulente in suini in accrescimento; la diagnosi e il corretto approccio terapeutico a questa infezione vengono spesso rese difficoltose dalle caratteristiche di crescita di questo batterio, particolarmente esigente.

Nel caso descritto il protocollo diagnostico ha incluso l'isolamento colturale e lo studio del profilo di antibiotico resistenza del ceppo tramite la valutazione della minima concentrazione inibente (MIC), permettendo una terapia antibiotica mirata.

DESCRIZIONE DEL CASO

In un allevamento a ciclo chiuso (800 scrofe) della provincia di Treviso sono stati segnalati numerosi casi di zoppia in animali di peso compreso tra gli 80 e i 100 kg. La zoppia colpiva circa il 30-40% degli animali del gruppo, la dolorabilità si manifestava indifferentemente a carico di uno o più arti anteriori o posteriori, anche in assenza di gonfiore della parte interessata. Gli animali non manifestavano febbre o calo dell'appetito.

I suini nati in azienda vengono vaccinati a 19 giorni per *Mycoplasma hyopneumoniae* con richiamo a 80 giorni assieme alla vaccinazione per Malattia di Aujeszky.

Un primo tentativo di favorire la ginnastica funzionale degli arti riducendo il numero di animali per box, assicurando maggiore possibilità di movimento, non ha portato a miglioramenti significativi.

In seguito le carcasse di tre animali colpiti sono state inviate alla Sezione Territoriale di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie per indagini anatomico-patologiche e le analisi del caso.

L'esame autoptico del primo soggetto ha evidenziato una infiammazione fibrinosa delle borse sinoviali e dei tendini nelle regioni dei metacarpi e metatarsi, iperemia del legamento della testa del femore e la presenza di liquido emorragico nell'articolazione coxo-femorale.

Il secondo soggetto presentava un evidente rigonfiamento dei carpi con infiammazione dei tessuti sottocutanei e iperemia del legamento della testa del femore.

Il terzo soggetto presentava edema dei tendini flessori superficiale e profondo dell'arto posteriore sinistro con infiammazione cronica dei tessuti circostanti e infiammazione fibrinosa a carico delle borse sinoviali delle articolazioni del gomito.

Indagini istopatologiche eseguite su campioni prelevati dalle borse sinoviali sopracitate dei tre soggetti, dai legamenti della testa del femore dei primi due soggetti, dai tessuti sottocutanei tibiali e dalla capsula articolare coxo-femorale del terzo soggetto, hanno confermato la presenza di un'infiammazione fibrino purulenta dei tessuti, associata a emorragie e infiltrazione linfoplasmocitaria.

Tamponi prelevati dalle borse sinoviali del primo soggetto, dal legamento rotondo del primo e secondo soggetto e dalle articolazioni del ginocchio del secondo soggetto, dei gomiti

del terzo soggetto, sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche tramite semina su Agar Sangue (AS) e Eosin Methylen Blue Agar (EMB) incubati in aria e AS con uno striscio di *Staphylococcus aureus* incubato in microaerofilia, risultando negativi.

Analisi in real time PCR per *Haemophilus parasuis* del contenuto delle borse sinoviali hanno dato esito negativo.

Si è proceduto alla ricerca tramite esame colturale di *Mycoplasma* spp. da tamponi effettuati dalle borse sinoviali del primo soggetto, dal legamento rotondo del primo e del secondo soggetto, dall'articolazione tibio-tarsica del primo soggetto, dall'articolazione del ginocchio del secondo soggetto, dalle borse sinoviali dei gomiti del terzo soggetto. Da sei di questi otto campioni sono stati isolati ceppi di *Mycoplasma* spp. identificati come *M. hyosynoviae* tramite DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Due di questi ceppi sono stati selezionati per la valutazione dell'antibiotico resistenza tramite metodica MIC, risultando sensibili a Tilmicosina, Tiamulina, Lincomicina, Florfenicolo, Spiramicina, Tilosina, Ossitetraciclina, Doxibacina. Entrambi i ceppi selezionati hanno mostrato resistenza nei confronti dell'Eritromicina e sono risultati uno resistente e uno intermedio per Enrofloxacin.

Il trattamento antibiotico con Lincomicina e Spectinomicina ha portato a una regressione dei sintomi anche se persistono casi di recidive in ingrasso; si sta di conseguenza valutando la possibilità di intervenire con un vaccino stabulogeno.

DISCUSSIONE

L'infezione da *M. hyosynoviae* è riconosciuta come causa di artriti non suppurative in suini in accrescimento, in particolare in fase di magronaggio-ingrasso, ed è ubiquitario nelle popolazioni di suini (Thacker et al., 2006).

Le scrofe fungono presumibilmente da *reservoir* dell'infezione infettando i suinetti durante i primi giorni di vita; l'infezione in seguito si trasmette tra i suinetti della stessa nidiata o tra suinetti di nidiate diverse nella fase di messa a terra e post. Una volta infettati gli animali possono rimanere portatori per tutta la vita (Ross et al., 1973).

La diagnosi di artrite da *M. hyosynoviae* è resa difficoltosa non solo dal fatto che molti animali possono diventare portatori in assenza di manifestazioni cliniche della patologia, ma anche dalle caratteristiche di crescita di questo patogeno, che oltre ad essere particolarmente esigente, richiede tempi di incubazione lunghi e che rendono ulteriormente difficoltosa la caratterizzazione dei ceppi. Va inoltre tenuto presente che anche batteri meno esigenti possono causare sintomatologia molto simile (*Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*) (Nielsen et al., 2001).

I fattori di rischio che portano allo sviluppo della patologia non sono ancora del tutto chiari, tuttavia sembra che fattori stressogeni, quali fluttuazione della temperatura, eccessiva densità degli animali o rimescolamenti dei gruppi possano favorire lo sviluppo di artriti da *M. hyosynoviae* (Ross, 1973).

Nel caso in esame, l'intervento sul principale fattore di stress rilevato, la densità degli animali, non ha comportato miglioramenti nella clinica e nella riduzione della diffusione della problematica.

La corretta diagnosi clinica e di laboratorio eseguite applicando un protocollo diagnostico che ha previsto l'esclusione di altri fattori infettivi e la completa caratterizzazione del profilo di antibiotico resistenza dei ceppi isolati hanno permesso di intervenire con una terapia antibiotica mirata che si è rivelata efficace nel contenimento della sintomatologia nella fase di magronaggio e ingrasso.

La manifestazione di recidive cliniche nella seconda fase di ingrasso suggerisce che parte degli animali mantengano lo stato di portatori, e che probabilmente è necessario un approccio più ampio al problema; per tale ragione si sta valutando la possibilità di un intervento vaccinale con un vaccino stabulogeno.

BIBLIOGRAFIA

1. Nielsen E.O., Nielsen N.C., Friis N.F. *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis in grower-finisher pigs (2001). J. Vet. Med. 2001 A 48, 475-486.
2. Ross RF. Predisposing factors in *Mycoplasma hyosynoviae* arthritis of swine (1973). J Infect Dis 1973, 127 (Suppl), S84-86.
3. Ross RF, Spear ML. Role of the sow as a reservoir of infection for *Mycoplasma hyosynoviae* (1973). Am J Vet Res 1973, 34, 373-378.
4. Thacker EL, Minion FC. Mycoplasmosis (2012). In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (eds.). Diseases of Swine. 10th ed. pp. 779-797. Wiley-Blackwell, Ames, 2012.

ABORTI NELLA FASE FINALE DELLA GESTAZIONE

GUADAGNINI G., SALVINI F., OTTOLINI F. PAOLETTI F.

PigVet Brescia

INTRODUZIONE

Il caso clinico si è verificato in un'azienda a ciclo chiuso situata in Lombardia: l'azienda ha 350 scrofe a ciclo chiuso ed è composta di 4 capannoni con stabulazioni miste. Il primo è un capannone composto da svezzamento, sale parto e magronaggio, il secondo è un ingrasso, il terzo è un capannone per la gestazione gabbie e box e per 3 stanze di magronaggio ed il quarto è un ingrasso. L'azienda ha un programma di autorimonta con introduzione di seme miglioratore e le scrofette prodotte dopo lo svezzamento vengono allevate con gli altri lattoni prima nei locali post-svezzamento e magronaggio. Le scrofette non transitano dall'ingrasso ma vengono portate in una quarantena esterna a circa 500 metri dall'allevamento. Vengono reintrodotte dopo l'applicazione di piano vaccinale aziendale e dopo essere state controllate per PRRSV.

Nell'autunno 2015 si verificano alcuni aborti in fase di gravidanza avanzata, circostanza che per l'azienda risulta abbastanza anormale. Inoltre, nelle settimane seguenti compaiono delle covate di suini che alla nascita si presentano in gran parte morti e i pochi nati vivi sono disvitali.

Vengono eseguite delle indagini sierologiche al fine di determinare la causa eziologica anche se clinicamente viene fatta una prima diagnosi di PRRSV, che deve essere confermata ed eventualmente rivista alla luce dei risultati delle analisi.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il periodo di osservazione del caso va da ottobre 2015 a gennaio 2017, ed ha colpito scrofe parentali e gran parentali di diverso ordine di parto. Le scrofe sono sottoposte ad intervento vaccinale per Malattia di Aujeszky a tappeto che viene eseguita in contemporanea alla vaccinazione per influenza ogni 4 mesi, per parvovirosi e mal rosso che viene eseguito in sala parto a 15 gg di lattazione e per PRRSV a 60 gg di gestazione con vaccino MLV.

La fertilità che di norma si attesta tra 85% e il 90% non ha subito alcuna variazione ma si è verificato un improvviso aumento di aborti nella fase terminale della gestazione e alla rilevazione di covate completamente morte o con pochi soggetti vivi ma disvitali. Tale fenomeno ha riguardato il 5% delle scrofe totali e circa il 20% delle coperture mensili. Dal punto di vista clinico non sono stati rilevati particolari segni clinici; tuttavia qualche soggetto presentava ipertermia ed i suinetti disvitali presentavano alta mortalità. Non si rilevavano particolari segni clinici in sala parto sui suinetti neonati vivi.

Tale situazione era concentrata solo su alcune covate e non generalizzata, inoltre gli animali principalmente colpiti erano di 1° e 2° parto e molti soggetti erano scrofe gran parentali.

Come primo intervento è stato introdotto un trattamento con paracetamolo per tutti i riproduttori ed è stato deciso di vaccinare tutte le scrofe a tappeto con vaccino per PRRSV MLV. Inoltre in tale circostanza è stato deciso di modificare il piano vaccinale inserendo la vaccinazione per PRRSV a tappeto ogni 3 mesi con vaccino MLV.

Il 19/11/2015 è stato eseguito uno screening di allevamento con un campionamento di 30 scrofe di diverso parto. Si monitorano PRRSV, Influenza, malattia di Aujeszky, parvovirosi, circovirosi e leptospirosi.

Si evidenzia importante positività per *Leptospira australis*/bratislava con 13 animali positivi su 30 con titoli da 1/100 a 1/6400, 1 soggetto positivo per *Leptospira canicola* con titolo 1/200, 1 soggetto positivo per *Leptospira grippotyphosa* con titolo 1/100, 4 soggetti positivi

per Leptospira icterohaemorrhagiae con titoli da 1/100 a 1/1600 e 10 soggetti positivi per Leptospira pomona con titoli da 1/100 a 1/6400 come indicato in tabella

Leptospira	Positive	negative	% positività
australis	13	26	43,3
canicola	1	29	3,3
grippotyphosa	1	29	3,3
icterohaemorrhagiae	4	26	13,3
pomona	10	20	33,3

Vengono analizzati i titoli anticorpali delle altre patologie ma passano in secondo piano la presenza di 3 scrofe negative per PRRSV e le 7 con S/P maggiore di 3,5, e alcuni titoli elevati per influenza H1N1 e H3N2 ma che potrebbero essere riconducibili alla vaccinazione recente con vaccino antinfluenzale a 2 valenze.

Analizzando i precedenti screening che venivano ciclicamente eseguiti sulle scrofette di rimonta non si rileva alcuna positività per leptospira anche se è stata cercata solo raramente. Nel mese seguente vengono eseguiti 2 screening su un totale di 27 scrofette e solo 2 presentano positività 1/100 per Leptospira australis.

Al ritrovamento di positività anticorpale per Leptospira si decide di trattare tutti i riproduttori con Clortetraciclina 20% nel mangime con dosaggio di 35gr/capo per 2 cicli ripetuti di 5 giorni.

In gennaio 2016 vengono prelevate 15 scrofe, 10 nullipare appena fecondate e 5 tra scrofe e scrofette che hanno nuovamente abortito, e vengono testata nuovamente per PRRSV e Leptospirosi con i seguenti risultati:

Leptospira	Nullipare positive	Scrofe Aborto positive	Negative
australis	1	2	13
icterohaemorrhagiae	0	1	14
pomona	0	4	11

Viene intensificato il trattamento dei riproduttori con Clortetraciclina 20% aumentando il dosaggio a 65 gr/capo per 5 giorni. Ogni 30 giorni viene eseguito un ciclo di trattamento dei riproduttori per 5 giorni.

Ogni 30 giorni vengono eseguiti i soliti screening sulle scrofette in entrata nella gestazione e viene eseguito il trattamento dei riproduttori con Clortetraciclina 20% nel mangime al dosaggio di 65gr/capo.

I seguenti screening evidenziano i risultati per leptospira raccolti nella seguente tabella:

Data	Capi prelevati	Tipo	N° positivi	% positivi	Leptospira
09/02/2016	16	Scrofette	6	37,5	australis
16/03/2016	6	Scrofette	0	0	-
19/03/2016	13	scrofe	7	53,8	australis
			3	23	Icterohaemorrhagiae
			8	61,5	pomona

In aprile 2016 vengono rilevate nefriti interstiziali in sede di macellazione, ma la situazione non viene segnalata ed al seguente conferimento presso il medesimo macello eseguito il 22/6/2016 vengono prelevate le lesioni renali ed eseguita PCR per Leptospira. In seguito a riscontrata positività, il 6 luglio 2016 l'allevamento viene posto sotto vincolo sanitario per leptospirosi dalla ATS.

In seguito a tale vincolo si analizza la situazione dell'allevamento con una riunione tra allevatore, veterinario aziendale e veterinario ufficiale.

Viene considerata l'implementazione del piano di derattizzazione, con aumento delle postazioni e della frequenza di controllo di queste. Vengono analizzati i numerosi trattamenti con Clortetraciclina e la cadenza mensile di tale trattamento sui riproduttori e viene previsto un trattamento ripetuto anche sui suini da ingrasso. Si analizza il flusso degli animali e si rileva la mancanza di introduzione di animali, ma solamente di seme miglioratore per i riproduttori granparentali e di seme di verri terminali.

Viene disposto il carico solo il venerdì sotto vincolo sanitario e viene disposto il controllo accurato di tutte le partite conferite al macello per il monitoraggio delle lesioni renali riferibili a leptospirosi.

Alla fine di agosto viene eseguito un monitoraggio su magroni in accrescimento su 2 gruppi di scrofette con diversa età e su due gruppi di suini grassi stabulati nei due diversi capannoni da ingrasso.

Solamente 3 suini, di cui un suino grasso pronto al carico, 1 magrone a fine magronaggio e una scrofetta di circa 100 kg risultano positivi con titoli di 1/100 e 1/200 per Leptospira australis, mentre lo screening del mese seguente sulle scrofette ne evidenzia la totale negatività.

In ottobre in seguito alla analisi di numerose partite al macello senza alcuna lesione viene tolto il vincolo sanitario.

La contaminazione dei giovani riproduttori è influenzata dai numerosi e ripetuti trattamenti antimicrobici, tuttavia alcune scrofette si positivizzano per leptospirosi e manifestano aborto. Per condizionare correttamente la rimonta è stata introdotto da pochi mesi un doppio intervento vaccinale con vaccino commerciale contenente colture inattivate di Leptospira pomona, hyos e bratislava.

DISCUSSIONE

L'infezione dell'allevamento è comparsa improvvisamente poichè da precedenti screening non si evidenziava positività per leptospirosi, anche se la leptospirosi era stata monitorata solo in un campione esiguo di animali perché non considerato esame di routine. La diffusione è stata molto veloce ed ha colpito soprattutto animali giovani e animali granparentali. La lotta ai roditori seppur massimizzata non ha portato a rilevanti miglioramenti della patologia e anche i ripetuti cicli di trattamento con Clortetraciclina non sono in grado di bloccare totalmente la diffusione della patologia. L'infezione ha un andamento discontinuo e tende a riattivarsi in un ciclo chiuso con grande numero di animali.

La vaccinazione dei riproduttori potrebbe essere di aiuto per un corretto condizionamento della rimonta che tende a positivizzarsi una volta introdotto in un allevamento positivo nonostante i ripetuti trattamenti antimicrobici. Tuttavia la vaccinazione delle scrofette toglie la possibilità di valutare la dinamica di infezione degli animali negativi che vengono introdotti in azienda positiva perché da positività sierologica da vaccinazione. Da attentamente valutare l'importanza del seme come vettore e le buone pratiche di biosicurezza necessarie alla protezione dell'allevamento, tuttavia non bisogna dimenticare che il controllo dei roditori resta un difficile capitolo dell'allevamento intensivo.

La collaborazione tra sistema veterinario pubblico e privato è essenziale per la corretta gestione di focolai di malattie infettive denunciabili che devono essere correttamente gestiti per garantire la salubrità dell'alimento e la necessità di produzione dell'allevamento.

MORTALITÀ DA PLEUROPOLMONITE DA *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* IN SUINETTI SOTTOSCroFA

USTULIN M.¹, GIORGIUTTI M.², TAGLIENTE D.¹, TARGHETTA C.¹, PIERASCO A.¹,
CONEDERA G.¹, VIO D.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone;

² Libero professionista, Pagnacco (UD)

INTRODUZIONE

Il presente report descrive una caso di mortalità dovuta a infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (*A. pleuropneumoniae*) in suinetti sottoscrofa.

A seguito di mortalità anomala in due nidi, le carcasse di due suinetti sottoscrofa di sette giorni di età sono state conferite alla Sezione Territoriale di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe). I dati anamnestici riportavano per entrambi i soggetti conferiti morte improvvisa, scolo nasale siero-emorragico e assenza di lesioni da schiacciamento.

Le lesioni anatomo-patologiche evidenziate includevano aree di polmonite necrotico emorragica associata a pleurite fibrinosa a carico dei lobi diaframmatici e versamento sieroso emorragico in torace. L'analisi di campioni di polmone ha permesso di isolare un ceppo di *A. pleuropneumoniae* e di evidenziare tramite RT-PCR la contemporanea infezione da virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino (PRRSV).

L'infezione da *A. pleuropneumoniae* è riconosciuta come causa di gravi polmoniti e pleuriti in suini in ingrasso e svezzamento, tuttavia, per quanto tale patogeno colonizzi abitualmente le tonsille dei suinetti già nelle prime settimane di vita, sono rari e poco descritti casi clinici negli animali sottoscrofa.

DESCRIZIONE DEL CASO

In un allevamento da riproduzione a ciclo chiuso della provincia di Udine con un parco scrofe di 600 animali, è stata registrata una mortalità anomala nelle nidi di due scrofe primipare con decesso del 50% dei suinetti. L'allevamento in questione è da considerarsi instabile per PRRSV, l'ultima segnalazione di forme cliniche nei riproduttori (aborti) è avvenuta due mesi prima del presente caso.

Nell'allevamento coinvolto è nota la diffusione endemica di *A. pleuropneumoniae* sierovarianti 8 e 9-11, con casi clinici occasionali in ingrasso e svezzamento.

Le scrofette vengono solitamente acquistate in allevamenti danesi PRRS free e acclimate. Il protocollo vaccinale del periodo di acclimatazione prevede non solo la vaccinazione per PRRS ma anche per *A. pleuropneumoniae*.

Sono stati conferiti alla Sezione Territoriale di Pordenone dell'IZSVe, per le analisi del caso due suinetti di 7 giorni di età, morti improvvisamente, con scolo nasale sieroso-emorragico, in assenza di lesioni riferibili a trauma da schiacciamento.

L'esame necroscopico effettuato sui due soggetti ha evidenziato vaste aree di consolidamento polmonare, di aspetto necrotico-emorragico associate a pleurite fibrinosa a carico dei lobi diaframmatici e medi, splenomegalia e linfadenomegalia.

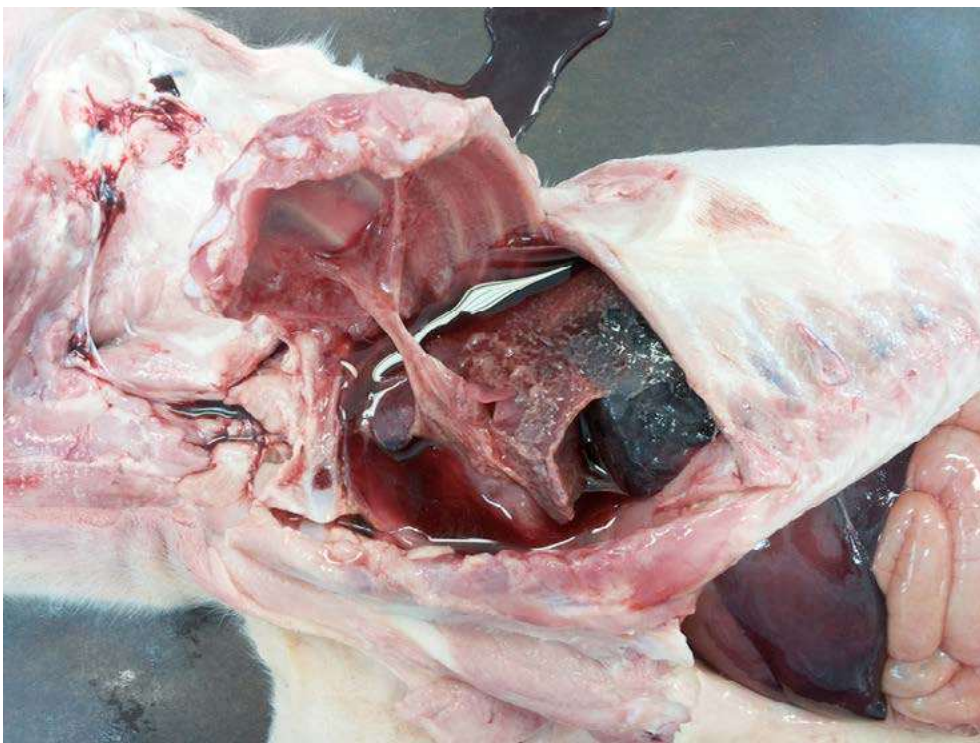


Figura 1: cavità toracica di uno dei soggetti conferiti.

Campioni di tessuto prelevati dai lobi diaframmatici sono stati inviati al Laboratorio di Istopatologia dell'IZSVe per l'esame istologico il quale ha permesso di classificare a livello microscopico le lesioni come grave broncopneumite fibrino-purulento-emorragica con aggregati batterici.

Sono stati effettuati esami batteriologici da pleura, milza, intestino, bronco, lobo diaframmatico, lobo medio destro e sinistro dei polmoni dei due soggetti. I campioni di milza e intestino sono stati seminati su agar sangue (AS) ed Eosin Methylen Blue Agar (EMB) in condizioni di aerobiosi, i restanti campioni sono stati seminati anche su AS con striscio di *Staphylococcus aureus* in microaerofilia. Da tutti i campioni di pleura, bronco e polmone è stato isolato in purezza un ceppo di *A. pleuropneumoniae*. Dai campioni di milza e intestino è stato isolato un ceppo di *Escherichia coli* (*E. coli*) emolitico.

Sono state inoltre condotte analisi in PCR per PRRSV e per *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*), dai polmoni di entrambi i soggetti risultando positive per entrambi i patogeni. Il ceppo di *A. pleuropneumoniae* è stato classificato come appartenente a uno dei sierotipi 1-9-11 tramite sieroagglutinazione rapida (Biovac, Beaucozè, Francia). Lo stesso ceppo, sottoposto a PCR per i geni codificanti per tossine Apx ha evidenziato la presenza di geni ApxIA, ApxIB, ApxII, inoltre il frammento del gene codificante per ApxIV amplificato ha mostrato un banda di 1600 bp; secondo il protocollo descritto da Rayamajhi et al., (2005) il pattern di tossine evidenziato corrisponde a quello dei sierotipi 9 e 11.

Il ceppo di *E. coli* isolato è invece risultato negativo in PCR per i geni codificanti per i principali antigeni fimbriali evidenziabili nei ceppi patogeni, ovvero F4 (K88), F5 (K99), F6 (P987), F18 e F41. Inoltre i test di sieroagglutinazione rapida hanno dato risultato

negativo per gli antigeni somatici più frequenti in *E. coli* patogeni per la specie suina (O8, O138, O139, O141, O147 e O149).

In conclusione il decesso dei suinetti è ascrivibile alla pleuropneumite da un ceppo di *A. pleuropneumoniae* endemico in allevamento, scatenata dall'infezione da PRRSV.

Ad oggi il caso presentato è l'unico evento noto di forma clinica da *A. pleuropneumoniae* in suinetti sottoscrofa evidenziato in azienda.

DISCUSSIONE

A. pleuropneumoniae è responsabile di gravi pleuropneumoniti soprattutto in animali in fase di magronaggio e ingrasso. È noto che questo batterio viene trasmesso dalla madre infetta alla prole durante le prime settimane di vita e colonizza le tonsille dei suinetti (Vigre et al., 2002), tuttavia l'attività protettiva degli anticorpi materni previene lo sviluppo di sintomatologia clinica. Ne consegue che i casi clinici vengono osservati a partire dalla fase di svezzamento, dopo il calo dell'immunità passiva. Inoltre, è necessaria la presenza di un fattore predisponente e scatenante di natura infettiva o non infettiva per lo sviluppo della forma clinica (Maes et al., 2001).

Nel caso in oggetto deve essere considerato che, benché avvenuto in un allevamento dove l'infezione da *A. pleuropneumoniae* è endemica entrambe le nidiata coinvolte appartenevano a scrofe primipare. Per quanto il programma di acclimatazione delle scrofette preveda la vaccinazione per *A. pleuropneumoniae*, è comunque possibile che le madri delle nidiata colpite avessero titoli anticorpali bassi in conseguenza di una procedura di vaccinazione scorretta o a una scarsa risposta immunitaria alla vaccinazione. Non è stato ritenuto utile eseguire la ricerca di anticorpi per *A. pleuropneumoniae* dal siero delle scrofette coinvolte in quanto il kit (IDEXX APP-ApxIV, IDEXX Laboratories, Inc. Maine, USA) in uso presso il nostro laboratorio identifica gli anticorpi contro la tossina-ApxIV, che vengono sviluppati solamente in corso di forme cliniche, non segnalate nelle scrofette. Tale tossina viene prodotta infatti solo in vivo e gli anticorpi contro di essa non sono presenti in portatori sani e animali vaccinati.

Le analisi condotte con metodiche biomolecolari a carico dei polmoni hanno dimostrato la presenza del virus della PRRS e di *H. parasuis* in entrambi i soggetti analizzati. Questi dati sono essenziali a capire le dinamiche dell'evento clinico in analisi in quanto in quanto l'infezione da PRRS è riconosciuta come uno dei principali fattori scatenanti nello sviluppo della pleuropneumite da *A. pleuropneumoniae* (Gottschalk et al., 2006).

A. pleuropneumoniae è una causa riconosciuta di mortalità elevata in suinetti sottoscrofa solo in allevamenti naïve (Bachmann et al., 1972), tuttavia nell'allevamento in considerazione l'infezione da *A. pleuropneumoniae* è endemica e le scrofette da rimonta routinariamente vengono vaccinate.

Questo caso evidenzia che la pleuro-pneumite da *A. pleuropneumoniae* debba essere presa in considerazione in diagnosi differenziale in caso di mortalità acuta anche in soggetti sottoscrofa e anche in allevamenti dove l'infezione è endemica. Il ruolo dell'infezione da PRRSV nello sviluppo delle lesioni dei segni clinici della patologia sottolineano ulteriormente l'importanza di una corretta procedura di acclimatazione delle scrofette per i patogeni presenti in azienda con particolare attenzione alla PRRS.

Il caso in oggetto risulta essere, a nostra conoscenza, l'unica evidenza presente in letteratura di forme cliniche da *A. pleuropneumoniae* in suinetti sottoscrofa in un allevamento in cui l'infezione sia endemica. Per quanto il caso descritto sia l'unico segnalato a oggi, anche nell'allevamento interessato, è possibile che abbia portato alla luce una problematica sottostimata.

BIBLIOGRAFIA

1. Bachmann P. Beitrag zur Epidemiologie der kontagiosen Pleuropneumonie beim Schwein. Schweiz Arch Tierheilk (1972); 114: 362-82.
2. Maes D, Chiers K, Haesebrouck F, Laevens H, Verdonck M, de Kruif A: Herd factors associated with the seroprevalences of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 2, 3 and 9 in slaughter pigs from farrow-to-finish pig herds (2001). Vet Res 2001, 32:409-419.
3. Rayamajhi N., Shin S. J., Kang S. G., Lee D. Y., Ahn J. M., Yoo H. S. Development and use of a multiplex polymerase chain reaction assay based on Apx toxin genes for genotyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates (2005). J Vet Diagn Invest 17:359-362
4. Vigre H., Ø, Barfod K, Lavritsen DT, Sørensen V. Transmission of *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs under field-like conditions: emphasis on tonsillar colonisation and passively acquired colostral antibodies (2002). Vet Microbiol. 2002 Oct 22;89(2-3):151-9.
5. Gottschalk M., Taylor D.J. (2006). *Actinobacillus pleuropneumoniae*. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Blackwell Publishing, Ames, IA, USA, pp. 563-576.

DESCRIZIONE DI ALCUNI CASI DI STEATOSI EPATICA ED IPOCALCEMIA NEL PERIPARTO

FUSCO L ^[1], TROGU E ^[2].

^[1] libero professionista, Reggio Emilia, ^[2] libero professionista, Milano.

INTRODUZIONE

Nel moderno allevamento suinicolo la crescente spinta produttiva ha fatto emergere nelle varie fasi del ciclo patologie in passato inesistenti. L'iperprolificità delle attuali genetiche comporta per le fattrici fabbisogni nutrizionali che devono essere perfettamente calibrati sia durante la gestazione che in lattazione. Inevitabilmente carenze o sovradosaggi andranno a creare problematiche in una o più fasi. Scopo del presente lavoro è quello di descrivere alcuni casi di steatosi ed ipocalcemia conseguenti alla somministrazione di una razione squilibrata in alcune componenti. Gli animali colpiti hanno manifestato la sintomatologia in sala parto, ma le indagini diagnostiche hanno in seguito mostrato quanto il problema fosse diffuso a tutta la mandria.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso in oggetto si è registrato nei mesi di marzo-maggio 2016 in una scrofaia in provincia di Reggio Emilia con 290 scrofe in produzione, di genetica PIC. La gestione è in banda trisettimanale e vi sono circa 40 parti per banda, di questi 8/10 avvengono una settimana prima degli altri e queste scrofe vengono utilizzate per i baliaggi. Dal mese di luglio 2015 l'alimentazione era stata modificata, unendo alle materie prime autoprodotte un nucleo acquistato esternamente. Tale scelta era stata presa per migliorare la produzione di latte, storicamente piuttosto bassa. In un primo tempo le scrofe in sala parto avevano migliorato le performance, ma da gennaio/febbraio 2016 la situazione era notevolmente peggiorata, arrivando alla formazione in ogni banda di 30/35 scarti su circa 450 suinetti svezzati. Nel mese di gennaio 2016 iniziarono a verificarsi alcuni blocchi nella pompa di alimentazione ed all'apertura dell'impianto venne repertata una notevole quantità di sabbia estremamente fine. Lo stesso materiale venne ritrovato nelle fosse del reparto gestazione. La mattina del 16 marzo in sala parto erano presenti e sincronizzate 30 scrofe. La settimana antecedente avevano partorito 10 scrofette ed una di esse dopo 2 giorni dal parto non riusciva più a mantenere la stazione quadrupedale. Al momento della somministrazione del carazololo si riscontrava la presenza di una scrofa a terra e di un altro animale che restava nella posizione di "cane seduto". Entrambe le scrofe la sera antecedente si erano alzate al momento del pasto. Altri due animali andarono a terra nei due giorni seguenti. Considerata la gravità della situazione e le perdite che si stavano registrando sui neonati vennero allontanati i suinetti e si iniziò una terapia a base di multivitaminici, selenio e calcio lattato; le scrofe vennero spostate in infermeria ed in data 20 marzo si effettuò un prelievo di sangue che la mattina successiva venne analizzato dal laboratorio di diagnostica veterinaria interno alla facoltà di Medicina Veterinaria di Milano.

Di seguito i risultati.

ID	GLUCOSIO	PROTEINE	CALCIO	GPT/ALT	ALP	GOT/AST	GGT
13T25	71 (mg/dl)	7,69 (g/dl)	9 (mg/dl)	93 (U/l)	40 (U/l)	320 (U/l)	30 (U/l)
14I89	81 (mg/dl)	7,36 (g/dl)	9,6 (mg/dl)	224 (U/l)	56 (U/l)	268 (U/l)	51 (U/l)
15I014	101 (mg/dl)	7,62 (g/dl)	10,2 (mg/dl)	57 (U/l)	40 (U/l)	349 (U/l)	26 (U/l)
15N194	84 (mg/dl)	6,84 (g/dl)	9,9 (mg/dl)	30 (U/l)	105 (U/l)	87 (U/l)	36 (U/l)
156090	69 (mg/dl)	7,84 (g/dl)	10,1 (mg/dl)	44 (U/l)	78 (U/l)	56 (U/l)	28 (U/l)
156099	60 (mg/dl)	7,56 (g/dl)	9,7 (mg/dl)	47 (U/l)	133 (U/l)	100 (U/l)	29 (U/l)

I dati sono stati confrontati con i parametri ottenuti dall’istituto zooprofilattico di Perugia grazie alla cortesia del Professor Vittorio Sala, riportati di seguito.

	PARAMETRI CHIMICO CLINICI	
	SCROFA	SUINO INGRASSO
	PROFILO EPATICO	
GPT - ALT (U/I)	20- 60	15- 50
GOT - AST(U/I)	36- 80	30- 70
GGT (U/I)	10-60	10-60
ALP (U/I)	100- 400	100- 400
BILIRUBINA TOT. (µmol/L)	0- 17.1	0- 17.1
GLICEMIA (mg/dl)	52-106	4.0- 8.0
PROTEINE TOTALI (g/L)	65- 90	60- 90
ALBUMINA (g/L)	30- 40	30-40
	PROFILO RENALE	
AZOTEMIA (mmol/L)	2.57- 9	2.0- 8.5
CREATININA (µmol/L)	140- 200	140- 200
PROTEINE TOTALI (g/L)	65- 90	60- 90
	FUNZIONALITA' MUSCOLARE-OSSEA	
LDH(U/I)	250- 350	250- 350
CPK (U/I)	61- 1251	120- 1000
ALP (U/I)	100- 400	100- 400
	ELETTROLITI	
SODIO (mmol/L)	135-150	135-150
CLORO (mmol/L)	94- 106	94- 106
POTASSIO (mmol/L)	4.4- 6.7	4.4- 6.7
MAGNESIO (mmol/L)	0.8- 1.1	0.6- 1
CALCIO (mg/dl)	9-13	2.16- 2.92
FERRO (mmol /L)	16.3- 35.6	16.3- 35.6
FOSFORO (mmol/L)	1.5- 2.2	2.3- 3.5

Le alterazioni dei parametri epatici sono state valutate dalla letteratura anche riferita ad altre specie

- AST: è indicativo non solo di danno epatocellulare, ma anche di danno muscolare; nelle vacche a terra è sovente aumentato
- ALT: alto nelle tre scrofe con i valori più alti di AST; può ricondurre ad un danno muscolare, oltre che ad una lipidosi epatica.
- ALP: una diminuzione potrebbe essere causata da un eccesso di vitamina D (causata dalla somministrazione dei multivitaminici?). Bisogna considerare che ad esempio nel gatto tale enzima ha un’emivita inferiore alle 8 ore, se così fosse anche nella scrofa il fattore di cui sopra potrebbe avere un ruolo nell’abbassamento riscontrato.

A fronte di tali valori e dei riscontri clinici il veterinario aziendale decise di procedere con un’indagine ecografica, sia sulle scrofe in sala parto che a campione sul resto della mandria. Non avendo trovato parametri di riferimento in bibliografia è stato necessario procedere prendendo in esame diverse specie, partendo da quanto disponibile in Medicina umana per passare poi ai test di Veterinaria sugli animali da compagnia. Sono state effettuate innumerevoli ecografie su animali giovani (suini in fase di magronaggio, alcune scrofette appena immesse nel reparto fecondazione), dalle quali si è evinto come l’immagine degli organi in esame corrispondesse alle immagini ecografiche di organi fisiologicamente sani sia umani che animali. Al contempo le successive indagini ecografiche sulle scrofe in gestazione e sala parto hanno evidenziato in molti animali alterazioni riconducibili a problematiche epatiche.



Figura 1. Lesioni a livello epatico riscontrate all’ecografia.

In data 30 marzo venne soppressa una scrofa: alla necropsia effettuata subito dopo la morte si evidenziarono lesioni a carico del fegato, della milza e dei reni.

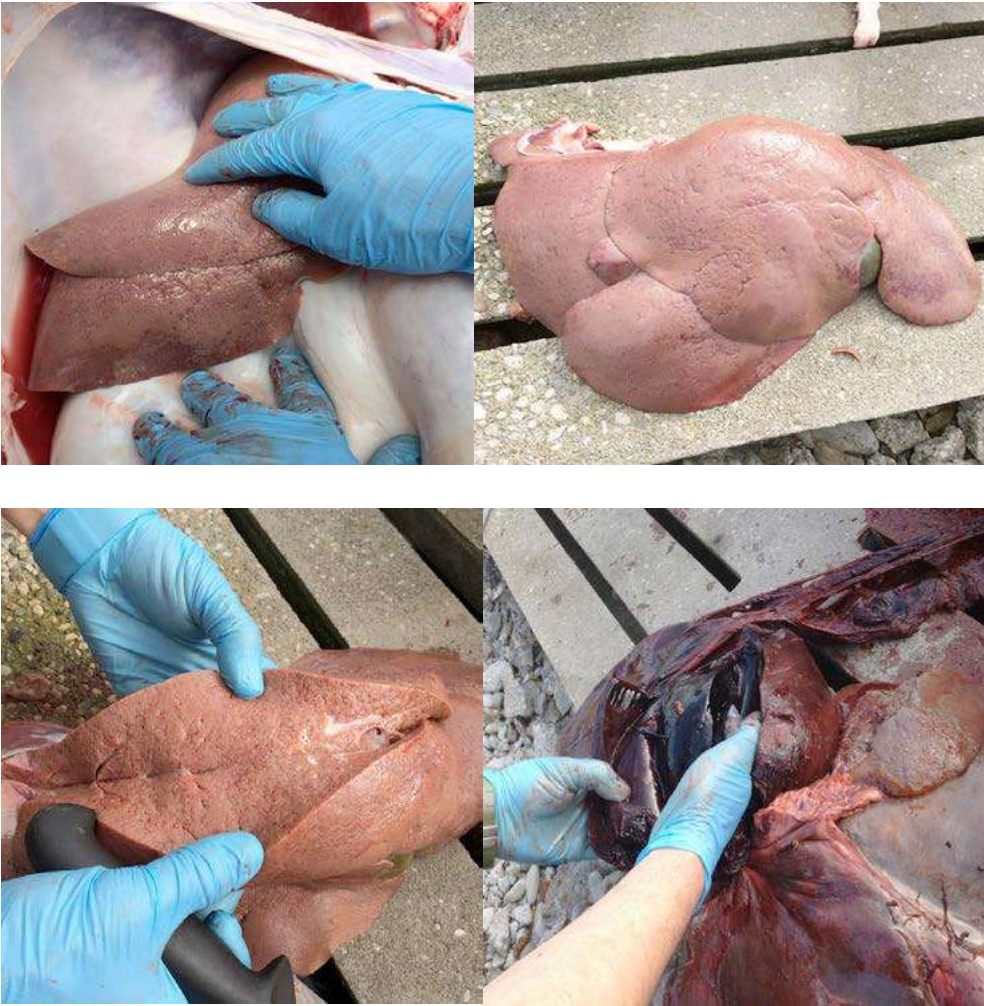


Figura 2. Da sinistra a destra: alterazioni a carico del fegato della scrofa abbattuta in data 30 marzo. In basso a destra lesione e conseguente coagulo nel fegato della scrofa deceduta in data 9 aprile.

Un'altra scrofa venne a morte nei 5 giorni successivi, mentre 3 scrofe riuscirono a recuperare la stazione quadrupedale e vennero inviate al macello. Dopo i parti della banda successiva (6 aprile) una scrofa morì in sala parto al 3° giorno di lattazione. Alla necropsia venne riscontrata una rottura a livello epatico che aveva portato alla morte per dissanguamento. Si decise quindi di compiere una seconda tranche di prelievi. Vennero selezionati 9 animali divisi in tre gruppi ed identificati con il numero aziendale:

- Gruppo A:** animali con problematiche cliniche non direttamente riconducibili al puerperio:
- 196099: scrofa al 32° giorno di lattazione (usata come balia), inappetente da tre giorni;
 - 152027: scrofa con ascite, le analisi sul liquido prelevato evidenziarono un essudato settico;
 - 15T181: scrofa al 43° giorno di gestazione che da 48 ore manifestava diarrea.

- Gruppo B:** scrofe a vari stadi di gestazione senza alcuna sintomatologia clinica:
- 158126
 - 154046
 - 153033

- Gruppo C:** scrofe in sala parto al 4° giorno di lattazione:
- 13D68 (21 nati vivi);
 - 152029 (17 nati vivi e 2 nati morti, parto avvenuto di notte);
 - 151101 (16 nati vivi), al momento del prelievo la covata pareggiata a 13 suinetti manifestava diarrea.

Di seguito i risultati

ID	GLUCOSIO	PROTEINE TOT	CALCIO	GPT/ALT	ALP	GOT/AST	GGT
196099 (A)	54 (mg/dl)	7.38 (g/dl)	12 (mg/dl)	50 (U/l)	172 (U/l)	268 (U/l)	36 (U/l)
15T181 (A)	58 (mg/dl)	6.62 (g/dl)	9.4 (mg/dl)	34 (U/l)	108 (U/l)	70 (U/l)	34 (U/l)
152027 (A)	50 (mg/dl)	7.8 (g/dl)	11.8 (mg/dl)	22 (U/l)	72 (U/l)	56 (U/l)	34 (U/l)
154046 (B)	98 (mg/dl)	8.14 (g/dl)	12 (mg/dl)	36 (U/l)	58 (U/l)	50 (U/l)	38 (U/l)
158126 (B)	77 (mg/dl)	7.15 (g/dl)	10.9 (mg/dl)	34 (U/l)	130 (U/l)	30 (U/l)	24 (U/l)
153033 (B)	74 (mg/dl)	7.5 (g/dl)	10.3 (mg/dl)	43 (U/l)	127 (U/l)	32 (U/l)	27 (U/l)
13D68 (C)	106 (mg/dl)	9.64 (g/dl)	12.6 (mg/dl)	44 (U/l)	168 (U/l)	250 (U/l)	52 (U/l)
152029 (C)	68 (mg/dl)	8.78 (g/dl)	12.2 (mg/dl)	36 (U/l)	170 (U/l)	90 (U/l)	32 (U/l)
151101 (C)	106 (mg/dl)	8.32 (g/dl)	12.6 (mg/dl)	38 (U/l)	30 (U/l)	124 (U/l)	60 (U/l)
Valori Rif.	52-106 (mg/dl)	3-4 (g/dl)	9-13 (mg/dl)	20-60 (U.I.)	100-400 U.I.	36-80 U.I.	10-60 U.I.

I valori di tutte e tre le scrofe in sala parto risultarono sopra la media per le AST, sebbene gli animali non manifestassero alcuna sintomatologia clinica. La ditta fornitrice del nucleo era stata informata già a gennaio del ritrovamento del materiale nelle pompe e nelle fosse e venne sollecitato l'invio dei risultati delle analisi effettuate sullo stesso: venne identificato come carbonato di calcio; contemporaneamente fu analizzata la percentuale dei vari nutrienti del nucleo, evidenziando una percentuale di proteine del 17,5% e di grassi del

6%. Si decise quindi di interrompere la somministrazione del nucleo in oggetto ed a tutta la mandria venne integrata la razione con un multivitaminico. Inoltre la curva venne modificata adattandola alle esigenze della genetica PIC. Il veterinario aziendale continuò a monitorare ecograficamente le scrofe all'ingresso in sala parto, somministrando in via preventiva multivitaminici ed epatoprotettori agli animali con alterazioni epatiche. Dopo 9 settimane dall'inizio della problematica la condizione delle scrofe in sala parto tornò alla normalità: la modifica della dieta e l'uso dei farmaci in via preventiva permisero di svezzare tutte le fattrici senza perdite. Al contempo anche la produzione latte iniziò a migliorare. Il monitoraggio ecografico continua ad oggi ad evidenziare soggetti con alterazioni epatiche, ma si tratta sovente di animali vecchi, al contrario sulle scrofette immesse recentemente non sono mai state riscontrate lesioni.

DISCUSSIONE

La gestione alimentare della scrofa deve essere sempre oggetto di massima attenzione, poiché errori sia quantitativi che qualitativi nella razione possono determinare problematiche a breve e lungo termine. Questo è ancor più rilevante se si prendono in esame le moderne genetiche iperprolifiche, nelle quali le fattrici devono dapprima supportare lo sviluppo di 15-20 feti, ed in seguito l'allattamento di almeno 12-13 suinetti. Nel caso in esame a nostro avviso tre sono state le cause scatenanti la sintomatologia: la mancanza di calcio (che verosimilmente si demiscelava ed è stato reperito sia nell'impianto di alimentazione sia nelle fosse), l'eccessiva quantità di grassi nella fase gestazione e l'uso di una curva troppo spinta per la genetica aziendale. La steatosi e l'ipocalcemia hanno quindi causato la sintomatologia nel periparto, che ha però permesso di individuare una problematica latente sull'intera mandria. È molto probabile che a fronte di uno solo di questi fattori la sintomatologia sarebbe stata meno evidente, o forse inapparente. Questa considerazione ci ha spinto ad interrogarci su quanto squilibri della formulazione o del razionamento possano essere causa di problematiche in varie fasi produttive (un esempio: le diarree alimentari nei suinetti neonati). Sovente le problematiche inerenti le scrofe in sala parto vengono liquidate con cause infettive; anche nel nostro caso da più parti sono state ipotizzate patologie di origine virale o batterica. Non essendone mai stati convinti abbiamo voluto approfondire con indagini di laboratorio tese a valutare la presenza di squilibri metabolici, che in effetti sono stati riscontrati ed erano la sola causa della sintomatologia. In questo caso abbiamo inoltre utilizzato un approccio innovativo, utilizzando la diagnostica per immagini che ha accertato alterazioni epatiche diffuse in tutta la mandria, che sono state poi confermate dall'esame anatomopatologico effettuato sulle due riproduttrici decedute in azienda. Alla luce di tutto ciò è stata modificata radicalmente la razione, riportando a valori più bassi la percentuale dei grassi e ridimensionando la curva sulle esigenze della specifica genetica; inoltre cambiando il nucleo si è tornato a fornire un adeguato apporto di calcio. Tutto questo ha permesso quindi di risolvere la problematica, sebbene ancora oggi vi siano animali che presentano alterazioni epatiche all'ecografia.

GESTIONE DI UN FOCOLAIO DI LEPTOSPIRA SEROVAR POMONA IN UN SITO 1

NIGRELLI A.D.¹, ROSIGNOLI C.¹, FACCINI S.¹, FRANZINI G.¹, D'INCAU M.¹, ALBORALI L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

INTRODUZIONE

Lo scopo del presente report è di descrivere un focolaio di aborti da *Leptospira pomona*, segnalato al Servizio Veterinario, riportando le azioni attuate per garantire sia la sanità pubblica e rendere sopportabile l'intervento alla produzione.

L'infezione da *Leptospira* è, ancora, abbastanza frequente nella specie suina; è in grado di provocare aborti, nati mummificati e nati morti nelle scrofe, e, nei soggetti all'ingrasso, nefrite interstiziale cronica, il cui rilievo, al macello è, di fatto, una sorveglianza passiva dell'infezione. La gestione di questa zoonosi non è semplice ed è prevista dal Regolamento di Polizia Veterinaria e dall'OM del 1985.

L. pomona infetta l'ospite attraverso le mucose o la cute, determina leptospiruria, che permane fino alla comparsa degli anticorpi (al momento dell'aborto sono già elevati) e si localizza a livello di feto e a livello renale, da cui è eliminata con le urine fino a 2 anni dopo l'infezione.

DESCRIZIONE

L'allevamento in questione è un sito 1 ristrutturato da poco, costituito da 3.000 scrofe in produzione con introduzione del seme e della rimonta dall'esterno.

Era riscontrata una sindrome abortiva con presenza di nati morti e mummificati.

I feti venivano esaminati per i vari agenti abortivi con esito negativo; il sangue delle scrofe che avevano abortito evidenziava titoli per *L. pomona*, tra 1:1600 e 1:6400, con metodo di microagglutinazione.

La situazione era segnalata al Servizio Veterinario competente e veniva impostata la seguente strategia:

- Controllo sierologico delle scrofette recentemente introdotte, al fine di escludere la rimonta, forse la via di ingresso dell'infezione nell'allevamento.
- Implementazione della derattizzazione.
- Pianificazione di due "canali" della stessa filiera di sito 2 e sito 3, tenuti in vincolo, al fine di poter trasferire la produzione nel periodo in cui l'allevamento era considerato focolaio.
- Monitoraggio sierologico di 100 scrofe, per verificare la diffusione dell'infezione che risultava intorno al 10%-12%, con titoli che variavano da 1:200 a 1:6400.
- Contemporaneamente al prelievo, tutte le scrofe e scrofette presenti sono state trattate per 40 gg. con kg 1,2/ql mangime in gestazione e kg 0,6/ql mangime in lattazione di ossitettraciclina 20%.
- Le turbe riproduttive cessavano nel giro di 5-7 gg., dall'inizio del trattamento.
- Veniva informato il personale dell'allevamento sulle misure di sicurezza da adottare per ridurre al minimo il rischio di infezione.
- E' stata bloccata la rimonta e alle scrofe fine carriera, ai fini della macellazione, sono stati applicati i 28 gg. di sospensione per trattamento in deroga, oltre ai 40 gg. di trattamento.
- Ricontrollo sierologico di tutte le scrofe dopo tre mesi dal primo controllo: le scrofe negative al primo prelievo erano rimaste negative, e quelle positive vedevano un abbassamento del titolo anticorpale.

Concordemente con ASL, Centro di Referenza Nazionale per la Leptospira e Servizio Veterinario Regionale è stata considerata l’assenza di circolazione di L. pomona e, quindi, la sterilizzazione delle scrofe dal patogeno.

DISCUSSIONE

Si è cercato di tutelare la sanità pubblica e di ridurre i problemi alla produzione che comunque ci sono stati: quando è stato tolto il vincolo al Sito 1, i Siti 2 e 3 dedicati al focolaio erano esauriti. Il tipo di trattamento prolungato ha giustificazione tecnica solo se effettuato contemporaneamente, in tutti gli animali presenti in un sito. Attualmente stiamo gestendo un focolaio di soggetti all’ingrasso allevati a ciclo continuo, in presenza di nefrite interstiziale cronica riscontrata al macello, costituito da capi con bassa prevalenza dell’infezione, attuando un depopolamento parziale, al fine di avere un periodo lungo corrispondente alla durata del trattamento e del periodo di sospensione di 28 gg. per trattamento in deroga, prima di inviare i soggetti al macello. In un sito 3, con produzione a vuoto-pieno, considerando il fatto che il rischio di persistenza dell’infezione è comunque basso per le caratteristiche stesse del tipo di produzione, il trattamento potrebbe essere ridotto, a mio avviso, a tre settimane. E’ comunque fondamentale gestire un focolaio al fine di estinguerlo il più rapidamente possibile, a tutela sia della sanità pubblica che della produzione.

BIBLIOGRAFIA

Cavirani S. (2013) in, Martelli P.
Le Patologie del Maiale, 1° ed., Milano, Le Point Vétérinaire Italie Srl, 499 – 507.

INFEZIONE CONGENITA DA POX VIRUS IN DUE SUINETTI

DE LORENZI G.¹, RAFFI V.², GIBELLI L.³, DOTTORI M.¹, BONILAURI P.¹, LUPPI A.¹

¹IZSLER, Reggio Emilia, Italy - ²SUIVET, Reggio Emilia, Italy - ³IZSLER, Milano, Italy

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è la descrizione di un caso di infezione congenita da Poxvirus in due suinetti neonati con lesioni disseminate sulla cute di tutto il corpo. L’esame istologico ha permesso di osservare le tipiche lesioni virus-indotte quali degenerazione vacuolare dei cheratinociti, inclusioni citoplasmatiche e vacuolizzazioni intranucleari. La diagnosi è stata confermata con la microscopia elettronica che ha permesso di evidenziare le particelle virali riferibili a Poxvirus dalle lesioni cutanee prelevate da entrambi i suinetti. L’infezione da Poxvirus nel suino è una patologia a diffusione mondiale causata da Swinepox virus (SWPV), con DNA a doppio filamento, dotato di envelope, unico membro del genere *Suipoxvirus* appartenente alla famiglia *Poxviridae*. L’infezione da SWPV può avere decorso acuto o subacuto e causa caratteristiche lesioni cutanee di aspetto tondeggianti, ombelicate, talvolta confluenti e crostose. La malattia si osserva generalmente nei suinetti, mentre negli adulti prevale la forma sub-clinica. Nel gruppo la morbilità può essere elevata, a differenza della mortalità che è invece generalmente trascurabile (Delhon et al., 2012). La modalità di trasmissione dell’infezione naturale non è del tutto chiarita, ma pare sia spesso associata a scadenti condizioni igieniche (Borst et al., 1990). Secondo alcuni Autori pulci e pidocchi potrebbero svolgere il ruolo di vettori meccanici del virus, causando la comparsa di lesioni cutanee nelle regioni meno cheratinizzate, come quella addominale e inguinale (Cheville, 1966). Tuttavia l’infezione è stata riscontrata anche in assenza di tali insetti, suggerendo sia la possibilità che siano coinvolti altri insetti vettori, sia che il virus possa essere trasmesso per via orizzontale (Paton et al., 1990). La trasmissione verticale è poco comune e segnalata in casi sporadici di infezione congenita in cui si osserva natimortalità e nascita di suinetti disvitali con lesioni cutanee disseminate su tutto il corpo (Borst et al., 1990; Paton et al., 1990; Moorkamp et al., 2008).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico oggetto di questo lavoro si è verificato in una azienda da riproduzione (sito 1) di 680 scrofe a banda quadri-settimanale e a flusso continuo. L’azienda effettuava rimonta interna utilizzando seme di razza Duroc italiana e i suinetti venivano svezzati a 6-7 kg. Il piano vaccinale è riportato in Tabella 1.

SCROFETTE	
prima settimana	Mhyo + PCV 2
70 giorni	Mhyo + PRV
100 giorni	PRV
180 giorni	Parvovirus + Mal Rosso
8 e 4 settimane pre-parto	SIV + <i>E. coli</i> + <i>C. perfringens</i> tipo D
SCROFE	
PRV + SIV + Parvovirus + Mal Rosso	

Tabella 1. Piano vaccinale di scrofette e scrofe (sito 1).
Table 1. Vaccinations of gilts and sows (site 1).

A metà Ottobre 2016 in una nidiata composta da 15 suinetti, subito dopo il parto in due soggetti venivano osservate lesioni cutanee disseminate su tutta la superficie corporea. Uno degli animali era già morto alla nascita, mentre l'altro mostrava abbattimento ed era disvitalo. Non si osservavano lesioni cutanee nelle scrofe, le condizioni igienico-sanitarie aziendali erano buone e non erano segnalati insetti o ectoparassiti.

I due suinetti sono stati quindi conferiti e sottoposti ad esame necroscopico presso l'IZSLER (sezione diagnostica di Reggio Emilia). Alla valutazione anatomopatologica venivano osservate lesioni cutanee tondeggianti con un diametro variabile da 0,5 a 3 cm a diversi stadi di sviluppo (Fig. 1). Alcune erano di piccole dimensioni, appiattite e di colore chiaro (macule), altre invece più grandi, sporgenti, ombelicate e alle volte con tendenza a confluire (papule); altre ancora erano delle pustole epidermiche crostose. Nessun'altra lesione macroscopicamente evidente è stata osservata in altri organi o apparati.

Le diagnosi differenziali prese in considerazione comprendevano: infezione da Poxvirus, dermatiti batteriche o fungine, le malattie vescicolari e parassitosi cutanee. In sede autoptica sono stati prelevati campioni di tessuto provenienti da cute, trachea, esofago, polmoni, stomaco, intestino, fegato e reni. Le porzioni di tessuto sono state fissate in formalina al 10% ed utilizzate per indagini istopatologiche. Rene e milza sono stati sottoposti ad esame batteriologico impiegando metodi standardizzati (semina su Hektoen agar e agar siero). Porzioni di cute interessate dalle lesioni precedentemente descritte sono state impiegate per indagini batteriologiche (semina su agar sangue) e per la ricerca di miceti (semina su terreno Sabouraud). Le piastre seminate con materiale patologico sono state incubate a 37°C per 48 ore, per le indagini batteriologiche e per 5 giorni per la ricerca di miceti.

L'esame istologico della cute ha messo in evidenza la presenza di pustole epidermiche e di aree necrotiche circoscritte che si estendevano dalla superficie dell'epidermide al derma superficiale. Le aree necrotiche erano circondate da cellule epidermiche con vacuolizzazioni citoplasmatiche dovute alla degenerazione idropica, vacuolizzazioni intranucleari e marginazione della cromatina. Nei cheratinociti si osservavano inoltre numerosi corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili (Fig. 2). Non erano presenti infine reperti microscopici di rilievo negli altri organi.

Gli esami batteriologici e la ricerca di miceti è risultata negativa per tutti i campioni.

Per l'individuazione del virus è stata utilizzata la ricerca tramite microscopio elettronico in colorazione negativa con la tecnica della ultracentrifugazione. Tale tecnica permette di identificare le particelle virali osservate, in quanto ogni singola famiglia virale presenta caratteristiche morfologiche peculiari.

La microscopia elettronica, attraverso il rilievo di particelle virali morfologicamente compatibili con Poxvirus, unitamente alle lesioni macro e microscopiche descritte ha confermato il sospetto diagnostico clinico, indirizzando la diagnosi verso un caso di infezione congenita da SWPV.

DISCUSSIONE

Il caso clinico presentato riguarda un'infezione congenita da SWPV in due suinetti della stessa nidiata. Altri studi precedenti riportano casi sporadici di infezione congenita ma, a nostra conoscenza, la patogenesi dell'infezione intrauterina non è ad oggi totalmente chiara.

Una delle ipotesi più probabili è che la scrofa possa presentare viremia dopo la diffusione del virus localizzato nelle lesioni cutanee e che possa sviluppare l'infezione intrauterina durante la gestazione.

Il virus non è mai stato isolato nel sangue di animali infetti (Delhon et al., 2012), quindi l'ipotesi più probabile è che la scrofa sviluppi una viremia breve e caratterizzata da basso titolo virale. L'infezione congenita nei suinetti potrebbe essere dovuta ad un'infezione primaria subclinica della scrofa, che nei neonati può risultare fatale per la presenza di un sistema immunitario immaturo. E' stato ipotizzato che nel caso in cui si abbia l'infezione della scrofa, il virus diffonda lentamente e gradualmente infettando i feti presenti in utero (Borst et al., 1990).

E' stato ipotizzato che la compartimentazione della placenta nella specie suina possa ostacolare la diffusione dell'infezione in utero da un feto all'altro (Borst et al., 1990). Questo potrebbe essere alla base della scarsa diffusione della problematica nella nidiata oggetto del caso clinico appena descritto, dove solo 2 suinetti su 15 erano coinvolti.

Poche settimane dopo questo primo episodio di infezione il problema si è ripresentato in un'altra nidiata coinvolgendo tre animali. Le lesioni cutanee in questo caso erano meno estese e meno gravi e dei 3 suinetti colpiti uno è riuscito a sopravvivere senza essere sottoposto a trattamenti. L'infezione da SWPV causa limitati danni economici e non rappresenta un problema in ambito di sanità pubblica, tuttavia quando è presente in allevamento non esistono specifici trattamenti da utilizzare atti ad eliminare l'infezione (Delhon et al., 2012). Il trattamento antibiotico può essere suggerito nel caso in cui compaiano dermatiti batteriche secondarie.

Considerando il relativamente basso impatto economico dell'infezione non sono presenti vaccini in commercio, ma le buone pratiche di allevamento e il controllo degli ectoparassiti dovrebbero essere sempre tenuti in considerazione per scongiurare il rischio di infezione.



Figura 1

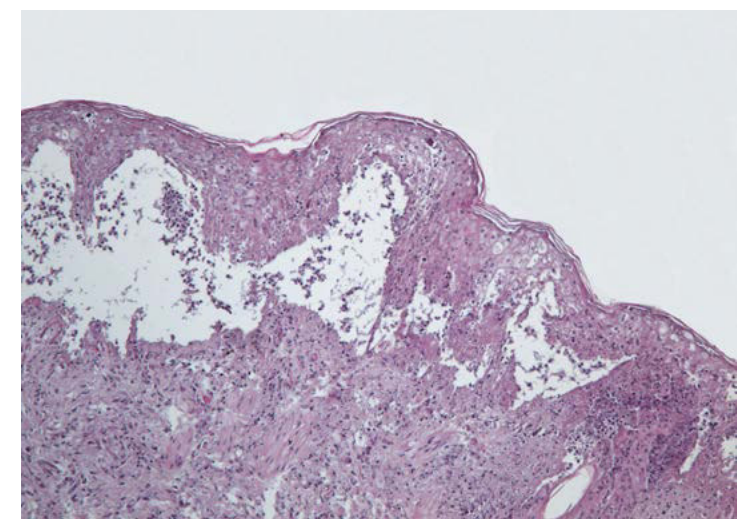


Figura 2

Fig. 1. Suinetto neonato. Lesioni cutanee disseminate sulla cute, tondeggianti, a diversi stadi di sviluppo, con un diametro variabile da 0,5 a 3 cm.

Fig. 1. Newborn piglet. Round skin lesions at different stages, with a diameter varying from 0,5 cm to about 3 cm, spread over the entire body.

Fig. 2. Suinetto neonato. Ingrandimento 20x, colorazione Ematossilina-eosina.

Degenerazione idropica del citoplasma dei cheratinociti, presenza di corpi inclusi intracitoplasmatici eosinofili e marginazione della cromatina.

Fig. 2. Newborn piglet. Magnification 20x, H&E stain. Hydropic degeneration of keratinocytes, eosinophilic and intracytoplasmic inclusion bodies and margination of chromatin can be observed.

BIBLIOGRAFIA

Borst G.H., Kimman T.G., Gielkens A.L., van der Kamp J.S. (1990) "Four sporadic cases of congenital swinepox". *Vet Rec.* 127 (3):61-3.

Cheville N.F. (1966) "The cytopathology of swine pox in the skin of swine". *Am J Pathol.* 49(2):339-52.

Delhon G., Tulman E.R., Afonso C.L., Rock D.L. (2012) "Swinepox Virus" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Scharz K.J., Stevenson W. "Diseases of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 456-460.

Moorkamp L., Beineke A., Kaim U., Diesterbeck U., Urstadt S., Czerny C.P., Rüberg H., Grosse Beilage E. (2008) "Swinepox--skin disease with sporadic occurrence". *Dtsch Tierarztl Wochenschr.* 115(4):162-6.

Paton D.J., Brown I.H., Fitton J., Wrathall A.E. (1990) "Congenital pig pox: a case report". *Vet Rec.* 127(8):204.

ENCEFALOMIOCARDITE IN UN ALLEVAMENTO DA RIPRODUZIONE: FORMA RIPRODUTTIVA E MORTALITA' IN SCROFETTE

LAZZARO M.¹, GIACOMINI E.¹, SCALI F.¹, SALOGNI C.¹, GIOVANNINI S.¹, PIZZONI G.¹, GRAZIOLI S.¹, GIBELLI L.³, NIGRELLI A.², ALBORALI G.L.¹

¹IZSLER, Brescia, Italy - ²IZSLER, Mantova, Italy - ³IZSLER, Milano, Italy.

INTRODUZIONE

Lo scopo del report è descrivere un episodio di Encefalomiocardite che ha coinvolto le scrofette da rimonta e le scrofe nella fase finale di gestazione causando rispettivamente mortalità e turbe riproduttive.

La malattia, diffusa in tutto il mondo, è causata da un Cardiovirus (EMCV) e colpisce mammiferi, uccelli e roditori. Nel suino sono descritte due principali forme sintomatiche: morte improvvisa per miocardite acuta nei soggetti giovani e disturbi riproduttivi nella scrofa gestante (Koenen, 1999).

In Italia i casi più gravi, con elevata mortalità, sono stati descritti nei suinetti mentre nei suini all'ingrasso solo sporadica mortalità o infezioni asintomatiche (Maurice et al, 2005). I roditori sono considerati ospiti naturali del virus (Koenen, 1999) ed il maggiore fattore di rischio per l'allevamento suino, dove le infezioni più severe avvengono attraverso l'ingestione di cibo contaminato da feci o urine di roditori infetti o con l'ingestione delle loro carcasse (Margot and Bakkali-kassimi, 2012).

I suini rappresentano un potenziale reservoir per EMCV, tuttavia, la rilevanza della trasmissione diretta tra suini è stata chiarita solo recentemente: la diffusione tra box, attraverso la trasmissione orizzontale, è poco probabile poiché richiede uno stretto contatto tra soggetti, cosa direttamente legata alle condizioni di management aziendale (Maurice et al., 2016).

Nei suini EMCV solitamente induce miocardite focale con morte improvvisa dei soggetti colpiti. La miocardite è caratterizzata da infiammazione cardiaca e necrosi dei cardiomiociti. In alcuni casi sono stati osservati altri sintomi come: anoressia, apatia, paralisi e dispnea (Margot and Bakkali-kassimi, 2012).

Nei suini, il cuore è il principale organo bersaglio, tuttavia EMCV può essere isolato anche da: cervello, milza, intestino, pancreas, fegato, reni, cuore, polmoni e linfonodi (Margot and Bakkali-kassimi, 2012).

I suini sensibili sviluppano una grave miocardite che li porta a morte, quelli più resistenti sviluppano una miocardite più lieve che può rimanere asintomatica. Non sono state segnalate lesioni cardiache nelle scrofe con problemi riproduttivi né tanto meno nei loro suinetti. Tuttavia, la patogenicità di EMCV nelle varie specie animali è risultata essere ceppo-dipendente (Margot and Bakkali-kassimi, 2012).

Nelle autopsie si trova accumulo eccessivo di essudato nelle cavità toracica ed addominale, mentre i cuori presentano aree focali di necrosi soprattutto nel ventricolo destro (con scolorimento irregolare di colore bianco grigiastro) (Koenen, 1999). Il virus può essere rilevato nel miocardio, anche quando le lesioni del miocardio sono piccole o assenti. L'analisi istologica dei cuori di suino rivela miocardite associata con l'infiltrazione e l'accumulo diffuso o localizzato di cellule mononucleate, congestione vascolare, edema e infarto, degenerazione della fibra, con necrosi. Nel cervello, la congestione è accompagnata da meningite, infiltrazione perivascolare di cellule mononucleate e degenerazione neuronale (Margot and Bakkali-kassimi, 2012).

Il virus può essere isolato su linee cellulari di diverse specie. Ci sono diversi test per l'identificazione degli anticorpi virali ma quello più specifico e più comunemente utilizzato è L'ELISA. Sperimentalmente l'utilizzo di RT-PCR ha avuto un notevole successo e più recentemente un metodo di trascrittasi inversa con amplificazione loop-mediata è stato segnalato come rapido, altamente sensibile, con possibilità di essere implementato in campo (CFSPH, 2015).

Non ci sono trattamenti per la patologia, nella fase acuta la mortalità può essere controllata diminuendo i fattori di stress ed eccitazione dei soggetti a rischio. I roditori giocano un ruolo chiave nell'introduzione e nell'aumento della diffusione del virus in allevamento. Alcuni tipi di pavimentazione come il grigliato, che permette una veloce rimozione delle feci dalle lettiere, sembra aiutare molto nel controllo della patologia in quanto riduce i tempi di esposizione dei suini al materiale contaminato (Maurice et al. 2007). Il virus è stabile in un ampio spettro di PH, può essere inattivato attraverso il trattamento a 60° per 30 min o con H2O contenente 0,5 ppm di cloro o ancora con disinfettanti a base di iodio o cloruro di mercurio (Margot and Bakkali-kassimi, 2012). Un eventuale aiuto può venire dalla vaccinazione degli animali in quanto si è visto che i soggetti vaccinati mantengono un'alta immunità umorale, e sono protetti dalla forma clinica e verso l'infezione transplacentare quando sperimentalmente sottoposti all'infezione con un ceppo virulento.

DESCRIZIONE DEL CASO

L'episodio si è verificato in un allevamento da riproduzione (sito 1) di 1150 scrofe organizzato con parti in bande settimanali. I suinetti sono svezzati a un'età media di 26-28 giorni con un peso di 7,4-7,6 kg.

Lo stato sanitario dell'allevamento è buono: stabile per PRRS ed indenne per Aujeszky. I suinetti sono vaccinati per M. Hyo e PCV2 in sala parto, all'arrivo in svezzamento non ricevono, di norma, nessun trattamento medicato. In passato ed occasionalmente si sono manifestati problemi di meningite causata da Streptococcus suis che sono trattati con successo utilizzando iniezioni e medicazione in acqua di bevanda con amoxicillina.

Prima del focolaio i risultati tecnici di quest'allevamento erano buoni con aborti inferiori al 1%, nati morti e mummificati < 0,5 % e perdite in sala parto inferiori al 10 %.

Nel mese di ottobre 2016 sono comparsi aborti e si è verificato un notevole aumento del tasso di feti mummificati, rispetto ai dati medi storici dell'allevamento. Anche la mortalità nei suinetti in sala-parto aveva mostrato un incremento, soprattutto riferito ai primi giorni di vita, per la presenza di soggetti disvitali (Tabella 1). Questi eventi patologici si sono verificati in scrofe di tutte le classi di parto e in nidiata di diverse sale parto senza necessariamente coinvolgere le nidiata contigue. Nei riproduttori erano rare altre manifestazioni cliniche, solo qualche caso di lieve rialzo febbrile e disoressia.

Tab. 1. Mortalità in sala parto, numero nati morti e mummificati per nidiata, % aborti

Parametri	Luglio 2016	Agosto 2016	Settembre 2016	Ottobre 2016	Novembre 2016	Dicembre 2016	Gennaio 2017
Perdite in sala parto	0,7	0,6	0,8	1,3	2,1	1,9	0,9
nati morti e mummificati per nidiata	0,5	0,4	0,6	1,2	1,8	1,9	0,8
aborti %	0,7	0,9	1,4	1,1	0,8	0,6	0,6

Nei mesi di novembre e, ancor più, dicembre si sono registrate mortalità improvvise anche nel settore delle scrofette in accrescimento (70-130 kg PV) (Tabella 2). In alcuni casi era possibile notare una fase clinica con intensa dispnea prima della morte.

Tab. 2. Mortalità in scrofette in accrescimento

Parametri	Luglio 2016	Agosto 2016	Settembre 2016	Ottobre 2016	Novembre 2016	Dicembre 2016	Gennaio 2017
% mortalità scrofette in accrescimento	2,5	1,3	2,8	2,3	10,2	16,5	6,2

Negli svezzamenti esterni, nello stesso periodo, non sono stati osservati sintomi o mortalità riconducibili all'episodio precedentemente descritto.

In concomitanza con la mortalità nelle scrofette, con i primi episodi di aborto e l'aumento dei soggetti nati morti e mummificati, sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e ad indagini di laboratorio: le carcasse di 4 scrofette di circa 130 kg di peso e 23 suinetti (11 feti e 12 nati morti da 5 scrofe).

L'esame necroscopico è stato eseguito secondo metodiche standardizzate presso il laboratorio. Dal materiale patologico prelevato durante le necroscopie sono state condotte indagini batteriologiche e virologiche.

Gli esami effettuati sui campioni prelevati in sede autoptica, secondo le metodiche standardizzate presso il laboratorio, sono schematizzati in Tabella 3

Tabella 3 Schema degli esami effettuati sugli organi prelevati

Campione	Provenienza	Indagine
Cuore	Scrofette, suinetti	Batteriologico, Immunoistochimica, RT-PCR EMCV, Esame istologico
Polmone	Scrofette, suinetti	RT-PCR PRRSV, Esame istologico
Milza	Scrofette, suinetti	Batteriologico, RT-PCR PRRSV, Esame istologico
Cervello	Suinetti ¹	Batteriologico, PCR virus Malattia di Aujeszky, Esame istologico
Rene	Suinetti ¹	Batteriologico, PCR Leptospira spp., Esame istologico
Fegato	Suinetti ¹	PCR virus pseudorabbia, Esame istologico
Pancreas		Esame istologico
Linfonodi (mesenterici,mediastinici e inguinali superficiali)		Esame istologico

Nei suinetti disvitali e in altrettante scrofe sono stati prelevati 25 campioni di sangue. Delle scrofe prelevate, 15 erano madri di nidiata colpite dalla grave forma clinica descrit-

ta e 10 madri di nidiate in cui i suinetti non hanno presentato alcun sintomo durante il focolaio. I campioni sono stati sottoposti alla ricerca di PRRSV e anticorpi anti-PRRSV, rispettivamente mediante RT PCR (Martinez et al., 2008) e test ELISA.

L'esame anatomopatologico nelle scrofette ha evidenziato lesioni ricorrenti, caratterizzate da: congestione pluriviscerale, edema polmonare, versamento sieroso pleurico e pericardico. Rari focolai di colore biancastro erano osservabili a livello miocardico. Nei soggetti disvitali e nati morti erano osservabili congestione poliorganica ed aree cardiache biancastre mentre nei mummificati non erano presenti lesioni macroscopiche. Le indagini batteriologiche hanno avuto esito negativo. Gli esami in PCR per la ricerca del virus della PRRS e della Malattia di Aujeszky, sono costantemente risultati negativi. Tutti i campioni testati in PCR per la ricerca di EMCV sono risultati positivi. Le indagini istopatologiche non hanno evidenziato lesioni di rilievo a livello di milza, rene, fegato, pancreas, linfonodi mesenterici, mediastinici ed inguinali superficiali. A livello cardiaco è stata evidenziata una miocardite interstiziale acuta associata a epicardite. Nelle sezioni istologiche del miocardio erano presenti numerosi focolai di flogosi con la presenza nell'interstizio di linfociti, macrofagi e neutrofili. La reazione immunoistochimica è risultata positiva soprattutto a livello del citoplasma dei miocardiociti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente caso clinico è stato descritto un grave focolaio di malattia, sostenuto da EMCV, in un allevamento intensivo da riproduzione situato in provincia di Brescia. Sono stati osservati contemporaneamente problemi riproduttivi e mortalità improvvisa in soggetti di pesi elevati.

Il focolaio di EMCV è stato confermato dalla presenza di caratteristiche lesioni istopatologiche a livello di miocardio e dalle positività della reazione immunoistochimica e della RT-PCR, nelle scrofette e nei soggetti nati morti e disvitali.

L'episodio oggetto del presente lavoro si è verificato in una zona geografica che negli ultimi anni è stata interessata da numerosi focolai di EMCV e, pertanto, potrebbe essere considerata endemica. Maurice e Colleghi avevano osservato una maggior frequenza di focolai nel suino in specifiche aree geografiche. La particolarità del focolaio illustrato in questo caso clinico è rappresentata dalla sua gravità. Sono state osservate contemporaneamente la forma riproduttiva e la forma cardiaca con mortalità in soggetti di pesi elevati. In questo episodio sono state osservate lesioni cardiache gravi anche nei soggetti adulti, diversamente da quanto precedentemente segnalato in focolai di EMCV, dove la gravità delle lesioni macroscopiche e di quelle istopatologiche del cuore è inversamente correlato all'età dei suini (Billinis et al. 2004). Nell'azienda del presente caso clinico il focolaio dell'EMCV ha causato rilevanti problemi di natura economica dovuti ad un aumento della mortalità e riduzione delle performance riproduttive. Considerando che ad oggi non vi sono trattamenti per l'EMCV, la prevenzione resta l'unica arma disponibile per ridurre gli effetti negativi causati dal virus. Così come consigliato anche dalla letteratura, si è proceduto alla corretta esecuzione dei piani di derattizzazione ed alla rimozione delle feci, nel più rapido tempo possibile, dai locali di stabulazione. Inoltre, si è dato il via ad una approfondita pulizia e disinfezione dei locali, dove erano stabulati gli animali che presentavano la sintomatologia, seguita da un periodo di vuoto sanitario per avere maggiori garanzie di eliminazione del virus dall'ambiente.

BIBLIOGRAFIA

Koenen, F., Vanderhallen, H., Castryck, F., & Miry, C. (1999). Epidemiologic, pathogenic and molecular analysis of recent encephalomyocarditis outbreaks in Belgium. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B*, 46(4), 217-231.

Martinez, T. A., Nevel, A., Twomey, D. F., & McGowan, M. R. (2008). Poor reproductive performance in pigs-a case series study. *Pig Journal*, 61, 49-56.

Carocci, M., & Bakkali-Kassimi, L. (2012). The encephalomyocarditis virus. *Virulence*, 3(4), 351-367.

Maurice, H., Nielen, M., Brocchi, E., Nowotny, N., Kassimi, L. B., Billinis, C., ... & Koenen, F. (2005). The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001. *Epidemiology and infection*, 133(03), 547-557.

Billinis, C., Leontides, L., Psychas, V., Spyrou, V., Kostoulas, P., Koenen, F., & Papadopoulos, O. (2004). Effect of challenge dose and age in experimental infection of pigs with encephalomyocarditis virus. *Veterinary microbiology*, 99(3), 187-195.

Maurice, H., Thulke, H. H., Schmid, J. S., Stegeman, A., & Nielen, M. (2016). The impact of compartmentalised housing on direct encephalomyocarditis virus (EMCV) transmission among pigs; insight from a model. *Preventive veterinary medicine*, 127, 105-112.

The Center for Food Security and Public Health (CFSPH) (2015). Encephalomyocarditis Virus. Reperibile su <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/shic-factsheet-encephalomyocarditis-virus>

POSTERS

RIDUZIONE CLINICA DELLA SALMONELLA ATTRAVERSO L'USO DEL *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* (MIYA-GOLD® S)

CLINICAL SALMONELLA REDUCTION WITH *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* (MIYA-GOLD® S)

KUNSTMANN L. ^[1], BACH J. ^[2], MEEDOM L. ^[1], HAUTEKIET V. ^[1], MONDIN P. ^[1]

^[1] Huvepharma NV; ^[2] Danvet Hobro - Denmark

Parole Chiave: Salmonella, *Clostridium butyricum*, suinetti

Key Words: Salmonella, *Clostridium butyricum*, piglets

INTRODUZIONE

Miya-Gold® S è un additivo zootecnico contenente spore vitali di *Clostridium butyricum*. Il probiotico produce naturalmente acido butirrico ed acido acetico nella parte distale dell'intestino, stabilizzando la microflora intestinale del suino.

Il progredire della mortalità nei suinetti svezzati viene analizzata prima e dopo l'utilizzo di Miya-Gold® S. L'allevamento oggetto della prova presentava un aumento dell'incidenza delle diarree non-specifiche e non rispondenti ai consueti trattamenti antibiotici.

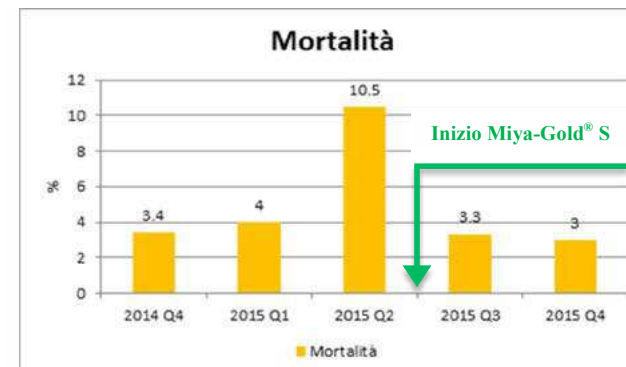
MATERIALI E METODI

Nel Sito 2 sono stati ristallati settimanalmente 700 suini svezzati provenienti dal Sito 1: i suinetti risultavano vaccinati per *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV-2 e le scrofe aziendali presenti nel Sito 1 erano positive per MYC+APP sierotipo 12. I suinetti ristallati sono stati alloggiati in aree adeguatamente lavate, asciugate e disinfettate.

Il mangime somministrato, non pellettato, è stato addizionato con Acido Benzoico; per i primi 14 giorni veniva aggiunto al mangime Ossido di Zinco a 2500 ppm. L'acqua di bevanda era trattata con acido formico a 1500 ppm mediante Dosatron.

L'allevamento aveva all'attivo uno storico di mortalità lievemente oltre i livelli di normalità: 3,4% nel 4° trimestre 2014 e 4,0% nel 1° trimestre 2015. Nel 2° trimestre del 2015 si è registrato un improvviso aumento della mortalità giunto ad un tasso del 10,5%. Nei primi 14 giorni successivi all'introduzione dei suini, tutti gli animali inseriti mostravano gravi sintomi di enterite: nell'esame di laboratorio sono stati isolati *E. coli* sierotipo 141 e Salmonella 4,12:i:. Le ricerche di laboratorio e le autopsie avevano identificato una tifo-colite necrotizzante.

Figura 1: evoluzione della mortalità





Diarrea clinica giallastra



Enterite fibrino-necrotica

I trattamenti antibiotici eseguiti seguendo le indicazioni desunte dagli antibiogrammi realizzati in laboratorio, hanno portato a effetti nulli o insignificanti sull'enterite e sulla mortalità. Alla settimana 28 si è iniziato ad aggiungere Miya-Gold® S in misura di 2 kg/ton nel primo mangime (per suini dai 6 ai 9 kg), in misura di 1 kg/ton nel secondo mangime (per suini dai 9 ai 15 kg) e 0,5 kg/ton nel terzo mangime (per suini dai 15 ai 30 kg).

RISULTATO

Le mortalità settimanali hanno subito un drastico calo dal 12% della settimana 27 al 3,1% della settimana 28. La mortalità media del 3° trimestre 2015 è stata del 3,3% per scendere ancora al 3% nel 4° trimestre del 2015. Il 10% dei suinetti ristallati mostrava ancora sintomi clinici all'arrivo e sono stati alloggiati in recinti di medicazione.

L'incremento medio giornaliero (IMG) è passato da 402 g/die nel 2° trimestre 2015 a 428 g/die nel 3° trimestre 2015, fino a raggiungere i 442 g/die nel 4° trimestre 2015.

CONCLUSIONI

Miya-Gold® S si rivela di grande efficacia nella stabilizzazione della flora intestinale dei suinetti. La presenza di *Clostridium butyricum* nell'intestino dei suinetti crea un ambiente meno favorevole allo sviluppo di Coli patogeni e Salmonelle spp., riportando l'incidenza della mortalità negli svezzati a livelli normali.

L'AGGIUNTA DI *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* (MIYA-GOLD® S) NEI SUINI COME BENEFICIO NELLA CONVERSIONE ALIMENTARE E NELL'ACCRESIMENTO MEDIO GIORNALIERO

SUPPLEMENTATION WITH *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* (MIYA-GOLD® S) IMPROVES FEED CONVERSION AND DAILY GAIN

KUNSTMANN L.^[1], BACH J.^[2], MEEDOM L.^[1], HAUTEKIET V.^[1], MONDIN P.^[1]

^[1] Huvepharma NV; ^[2] Danvet Hobro - Denmark

Parole Chiave: Salmonella, *Clostridium butyricum*, suinetti

Key Words: Salmonella, *Clostridium butyricum*, piglets

INTRODUZIONE

La prima esperienza sul campo in Danimarca sull'aggiunta del *Clostridium butyricum* (Miya-Gold® S) al mangime si è svolta in un allevamento multisito che adottava una produzione interna del mangime.

Miya-Gold® S è un additivo zootecnico contenente spore vitali di *Clostridium butyricum*. Il probiotico produce naturalmente acido butirrico ed acido acetico nella parte distale dell'intestino, stabilizzando la microflora intestinale del suino.

MATERIALI E METODI

L'allevamento oggetto della prova è di tipo Sito 2 SPF, che alleva circa 22.000 suinetti all'anno dai 7 ai 30 kg. I suinetti provengono dal Sito 1 dove vengono allevate le scrofe aziendali e dove i suinetti vengono vaccinati per PCV Tipo 2. Nel Sito 2 si manifestano casi di enterite, che sebbene non causino grave mortalità, riducono la resa produttiva.

Poiché l'allevamento aveva all'attivo uno storico di positività alla Salmonella, confermata da analisi di laboratorio, si è deciso di iniziare ad aggiungere Miya-Gold® S al mangime nell'ultima settimana del mese di Luglio del 2015 con l'intento di migliorare le prestazioni zootecniche.

Dopo lo svezzamento ai suinetti è stato somministrato per qualche giorno ancora il mangime sottoscrofa prima di passare ad un mangime prodotto internamente all'azienda contenente 3000 ppm Ossido di Zinco (suini dai 6 ai 9 kg) a cui è stato aggiunto Miya-Gold® S in misura di 2 kg/ton. Al secondo mangime internamente prodotto destinato ai suinetti dai 9 ai 15 Kg, è stato aggiunto Miya-Gold® S con inclusione di 1 kg/ton, per poi passare a 0,5 kg/ton nel terzo mangime (destinato ai suini dai 15 ai 25 kg). L'ultimo mangime (per suini dai 25 ai 35 kg) non conteneva Miya-Gold® S.

I dati relativi alla conversione degli alimenti e all'accrescimento giornaliero sono stati monitorati nei tre mesi precedenti l'inserimento del probiotico nel mangime (4328 suinetti venduti) e nei quattro mesi successivi all'inizio dell'aggiunta di Miya-Gold® (6421 suinetti venduti). I calcoli dell'energia utili alla comparazione si sono basati sulle formule del produttore dell'integratore. I suini oggetto della prova sono rimasti in allevamento 53 giorni in media.

RISULTATO

L'incremento medio giornaliero (IMC) ha registrato un netto miglioramento, passando da 414 g/die a 499 g/die. L'indice di conversione (ICA) è anch'esso migliorato da 1,86 a 1,81 kg di mangime per ogni kg di peso incrementato che, trasformato in energia secondo il sistema

danese, è passato da 2,06 FEs a 1,81 FEs per ogni kg di peso incrementato. Il risparmio di costo ottenuto è stato pari a 0,06 € per kg di suino prodotto.

	Controllo	Miya Gold® S
IMC (g/die)	414	499
ICA	1.86	1.81

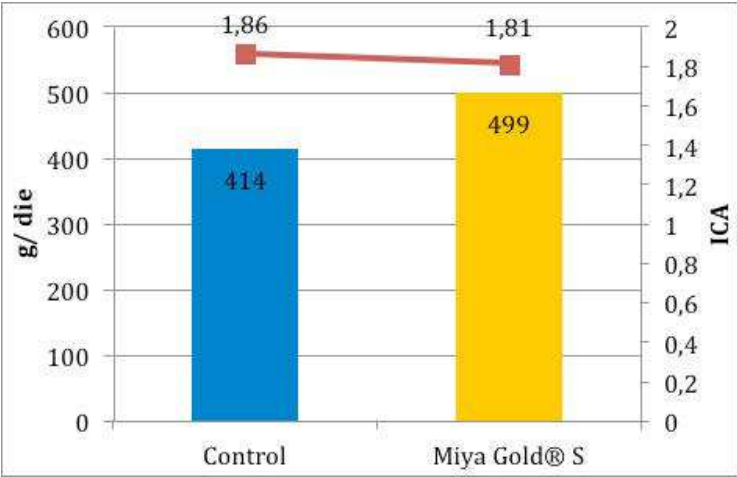


Figura 1 : Prestazioni (software gestionale del mangimificio)

CONCLUSIONI

Il controllo delle condizioni di salute dell'intestino dei suinetti è fondamentale per potenziare la resa produttiva degli animali. In questa prova, l'utilizzo di Miya-Gold® S ha dimostrato la riduzione dei costi alimentari (10%) e un miglior flusso degli animali nel periodo di post-svezzamento.

EFFETTO DELL'ARPAGOSIDE SUL BURST RESPIRATORIO DEI NEUTROFILI DI SUINO

HARPAGOSIDE'S EFFECT ON THE RESPIRATORY BURST OF PORCINE NEUTROPHILS

MOSCA F., MARRUCHELLA G., MARIANI F., TISCAR PG.

Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Piano d'Accio snc, Teramo

Parole chiave: Neutrofili, Fitoestratti, Burst respiratorio
Key words: Neutrophils, Phytoextracts, Respiratory burst

Riassunto
L'artiglio del diavolo (*Harpagophytum procumbens*) è una pianta tuberosa particolarmente ricca di arpagoside, glicoside a ben nota attività anti-infiammatoria. Infatti, gli estratti della pianta hanno trovato rapida applicazione in campo medico nel trattamento di patologie infiammatorie croniche a carico del sistema muscolo-scheletrico. Nel presente studio, l'attività dell'arpagoside è stata valutata *in vitro* sul burst respiratorio di granulociti neutrofili di suino, evidenziando una significativa attività di inibizione della produzione di specie reattive dell'ossigeno. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire i meccanismi di azione, le vie metaboliche ed i livelli farmacocinetici dell'arpagoside, come pure per verificare gli effetti additivi o sinergici di altre molecole presenti nei fitoestratti di *H. procumbens*.

Abstract
Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) is a tuberous plant particularly rich in harpagoside, a glycoside provided with well-known anti-inflammatory properties. Indeed, the plant's extracts are currently used in humans for long-term treatment of chronic, inflammatory musculo-skeletal disorders. In the present study, the *in vitro* effects of harpagoside on the respiratory burst of porcine neutrophils were investigated. Our results showed a significant inhibition of the production of reactive oxygen species. Further studies are required to understand the mechanisms of action, the metabolic pathways and the pharmacokinetic levels of harpagoside, as well as to verify the potential additive and synergic effects of the other *H. procumbens*' active constituents.

INTRODUZIONE
L'artiglio del diavolo (*Harpagophytum procumbens*) è una pianta xerofila di tipo tuberoso. Impiegata per secoli come anti-infiammatorio naturale dalle popolazioni del Kalahari in Africa (van Wyk, 2008), la pianta venne introdotta in Europa ai primi del '900, suscitando particolare interesse per le proprietà farmacologiche degli estratti ottenuti dalle radici secondarie, efficaci nel trattamento di patologie infiammatorie croniche dell'apparato muscolo-scheletrico (Grant et al., 2007; Gagnier et al., 2004). I glicosidi iridoidi costituiscono i più importanti principi attivi di *H. procumbens*. In particolare, l'efficacia degli estratti sembra strettamente correlata alla concentrazione di arpagoside – sia *in vivo* (Chrubasik et al., 1999) che *in vitro* (Anauate et al., 2010) – tanto che la Farmacopea europea ha definito un livello minimo di arpagoside (≥ 1.2%) nelle preparazioni commerciali ottenute dalle radici di *Harpagophytum* (European Pharmacopeia, 2005). I granulociti neutrofili ("polimorfonucleati", PMN) sono cellule effettrici dell'immunità innata a prevalente attività fagocitaria. La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) durante il burst respiratorio è un evento chiave del processo fagocitario. I ROS hanno un notevole potere microbicida; tuttavia, possono danneggiare cellule e tessuti dell'ospite, soprattutto in corso di

processi infiammatori cronici e/o particolarmente intensi (Manda-Handzlik and Demkow, 2015). Questo studio si pone l'obiettivo di valutare l'azione dell'arpagoside sul *burst* respiratorio dei PMN di suino sottoposti a stimolazione fagocitaria.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Sono stati oggetto di studio 11 suini "ibridi commerciali" di circa 160 Kg p.v. e 10 mesi di età. I suini sono stati regolarmente macellati ed il sangue raccolto in provette con anticoagulante (EDTA) al momento della iugulazione.

Purificazione dei PMN

I campioni di sangue sono stati diluiti in PBS (1:1 v/v), stratificati su gradiente Histopaque 1077 e centrifugati. Il *pellet* è stato risospeso in tampone di lisi (150 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , pH 7.4, 0.4% EDTA) ed incubato per 15 min al fine di rimuovere gli eritrociti. I PMN sono stati nuovamente lavati in PBS per due volte ed infine risospesi in DMEM.

La purezza del preparato cellulare è stata valutata microscopicamente previa colorazione con Hemacolor® (Merck), su un numero non inferiore a 500 PMN. Inoltre, la vitalità e la concentrazione cellulare del preparato sono state misurate con un apposito strumento (Vi-Cell, Beckman Coulter), standardizzando la concentrazione ad un valore di $3 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$.

Valutazione quantitativa del *burst* respiratorio

Ciascun campione è stato suddiviso in aliquote, posto in piastre a 96 pozzetti ed incubato per 2 ore a 37 °C con differenti concentrazioni di arpagoside (400, 200, 100, 10, 1 µg/ml). Un'aliquota non è stata trattata con arpagoside al fine di fornire valori di riferimento del *burst* respiratorio. Successivamente, la piastra è stata centrifugata, i PMN lavati in PBS ed incubati con il luminolo (1 mM per 10 min).

Il *burst* respiratorio è stato indotto con cellule di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*) e la luminescenza è stata monitorata mediante lettore multi-modale (Sinergy H1, Bio-Tek) per 2 ore, con letture di ogni singolo pozzetto ad intervalli di 1 min. I dati sono stati espressi dallo strumento come AUC ("Area Under Curve") e successivamente riportati in termini percentuali rispetto ai valori di riferimento.

Al fine di evidenziare eventuali effetti tossici, la vitalità e la concentrazione dei preparati sono state, inoltre, valutate 2 ore dopo l'incubazione con arpagoside alla concentrazione massima utilizzata nel presente studio (400 µg/ml).

Ove non diversamente specificato, tutti i reagenti in uso sono stati acquistati dalla Sigma-Aldrich.

Analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante ANOVA ad una via e test *post-hoc* di Tukey's, con livello di accettabilità di $p < 0.001$.

RISULTATI

Purificazione dei PMN

La metodica di purificazione ha permesso di ottenere sospensioni cellulari adeguatamente purificate (PMN >90%, Fig. 1) e vitali (vitalità >85%).

Misurazione *burst* respiratorio

Il trattamento con arpagoside ha determinato un significativo decremento della luminescenza, a concentrazione di 400 µg/ml ($p < 0.0001$), 200 µg/ml ($p < 0.0001$) e 100 µg/ml ($p < 0.001$). Nel confronto con i valori di riferimento, l'esposizione a tali concentrazioni ha determinato una percentuale di luminescenza del 56.8 ± 10.6 , 68.7 ± 11.1 e 81.6 ± 12.9 , rispettivamente (Fig. 2). Al contrario, concentrazioni di arpagoside pari a 10 µg/ml e 1 µg/ml non hanno determinato significative variazioni della risposta.

L'esposizione dei PMN a 400 µg/ml di arpagoside non ha comportato variazioni significative della loro concentrazione e vitalità.

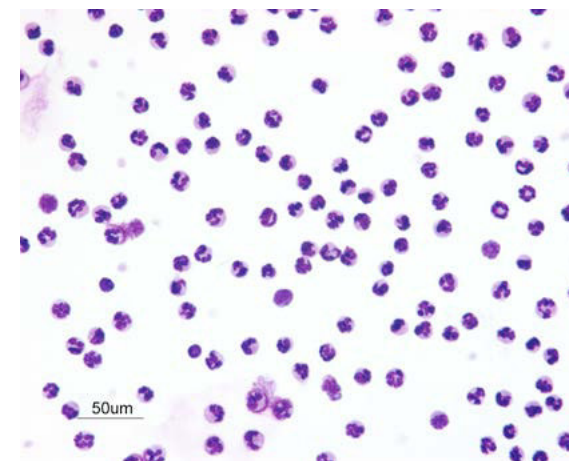


Figura 1. Striscio di purificato cellulare colorato con Hemacolor®. L'immagine conferma che la popolazione cellulare così ottenuta è costituita quasi esclusivamente da granulociti polimorfonucleati. Ob. x40 (bar = 50 micron).

Figure 1. Isolation of PMNs from blood samples. Microscopic observation after staining with Hemacolor® confirms that the cellular population mostly consist of PMNs (final magnification = x400).

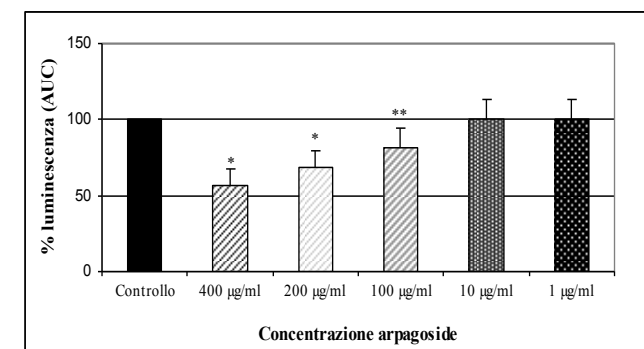


Figura 2. Effetti dell'arpagoside sul *burst* respiratorio di PMN. I valori sono stati riportati come luminescenza (AUC) in termini percentuali rispetto ai valori di controllo (100%). (* $p < 0.0001$ vs controllo; ** $p < 0.001$ vs controllo)

Figure 2. Harpagoside's effects on the PMN respiratory burst. Data are expressed as percentage of the luminescence (AUC) compared to control values (100%). (* $p < 0.0001$ vs control; ** $p < 0.001$ vs control).

DISCUSSIONE

Negli ultimi decenni, l'impiego delle piante medicinali ha suscitato notevole interesse scientifico, soprattutto nei confronti di estratti in grado di modulare il sistema immunitario (Huang et al., 2008). A fronte di numerosi studi volti a verificare il potenziale impiego delle piante medicinali negli animali da reddito (Clausen et al., 2013), sono tuttora pochi i dati disponibili circa le proprietà anti-infiammatorie dei fitoestratti nella specie suina (Liu et al., 2012, 2013; Kori et al., 2009).

Nel presente studio, l'arpagoside ha determinato un significativo decremento del *burst* respiratorio nei PMN a concentrazioni superiori a 100 µg/ml. I meccanismi di inibizione del *burst* respiratorio non sono stati ancora chiariti. Tuttavia, ciò non sembra dipendere dall'azione antiossidante dell'arpagoside (Grant et al., 2009; Betancor-Fernández et al., 2003), ma piuttosto dall'inibizione dell'enzima NADPH ossidasi, responsabile dell'attivazione del *burst* respiratorio con produzione di anione superossido (El-Benna et al., 2009). Al riguardo, è utile ricordare che altri estratti vegetali si sono dimostrati capaci di inibire l'assemblaggio della NADPH ossidasi nei PMN (Boukemara et al., 2016; Varga et al., 2004). Inoltre, come già noto per altri fitoestratti (Nastasijević et al., 2012; Tsumbu et al., 2012), l'effetto dell'arpagoside potrebbe anche dipendere dall'inibizione della mieloperossidasi, sistema enzimatico parimenti coinvolto nel *burst* respiratorio. Ad oggi, è difficile ipotizzare dosaggi e livelli plasmatici di arpagoside da raggiungere per ottenere l'effetto desiderato. Analogamente, è utile rimarcare che anche gli effetti dei farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) sul *burst* respiratorio dei PMN sono piuttosto controversi. Molti FANS inibiscono la sintesi di ROS in PMN umani a concentrazioni estremamente variabili (Parij et al., 1998) e ben superiori ai livelli farmacocinetici descritti (Netter et al., 1989).

CONCLUSIONI

In conclusione, riteniamo che i dati qui riferiti rappresentino un utile punto di partenza per lo studio delle proprietà anti-infiammatorie dell'arpagoside nella specie suina e, più in generale, in ambito comparato. Ulteriori indagini saranno necessarie per chiarire i meccanismi di azione, le vie metaboliche ed i livelli farmacocinetici dell'arpagoside, come pure per verificare gli effetti additivi o sinergici di altre molecole (glicosidi iridoidi e feniletanoidi etc.) presenti nei fitoestratti di *H. procumbens*.

BIBLIOGRAFIA

Anauate M.C., Torres L.M., de Mello S.B. (2010) "Effect of isolated fractions of *Harpagophytum procumbens* D.C. (devil's claw) on COX-1, COX-2 activity and nitric oxide production on whole-blood assay". *Phytother Res* 24, 1365-1369.

Betancor-Fernández A., Pérez-Gálvez A., Sies H., Stahl W. (2003) "Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity". *J Pharm Pharmacol* 55, 981-986.

Boukemara H., Hurtado-Nedelec M., Marzaioli V., Bendjeddou D., El Benna J., Marie J.-C. (2016) "*Anvillea garcinii* extract inhibits the oxidative burst of primary human neutrophils". *BMC Complement Altern Med* 16, 433. doi: 10.1186/s12906-016-1411-1417.

Chrubasik S., Junck H., Breitschwerdt H., Conradt C., Zappe H. (1999) "Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomised, placebo-controlled, double-blind study". *Eur J Anesthesiol* 16, 118-129.

Clausen J., Albrecht H., Mathie R.T. (2013) "Veterinary clinical research database for homeopathy: Placebo-controlled trials". *Complement Ther Med* 21, 115-120.

European Pharmacopoeia. (2005) "Devil's claw root". 5th edition, monograph 1095, p. 1401.

Gagnier J.L., Chrubasik S., Manheimer E. (2004) "*Harpagophytum procumbens* for osteoarthritis and low back pain: A systematic review". *BMC Complem Altern M* 4, 13.

Grant L., McBean D.E., Fyfe L., Warnock A.M. (2007) "A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*". *Phytother Res* 21, 199-209.

Grant L., McBean D.E., Fyfe L., Warnock A.M. (2009) "The inhibition of free radical generation by preparations of *Harpagophytum procumbens* in vitro". *Phytother Res* 23, 104-110.

Huang C.-F., Lin S.-S., Liao P.-H., Young S.-C., Yang C.-C. (2008) "The immunopharmaceutical effects and mechanisms of herb medicine". *Cell Mol Immunol* 5, 23-31.

Kori S., Namiki H., Suzuki K. (2009) "Biphasic regulation of polymorphonuclear leukocytes spreading by polyphenolic compounds with pyrogallol moieties". *Int Immunopharmacol* 9, 1159-1167.

Liu Y., Song M., Che T.M., Almeida J.A.S., Lee J.J., Bravo D., Maddox C.W., Pettigrew J.E. (2013) "Dietary plant extracts alleviate diarrhea and alter immune responses of weaned pigs experimentally infected with a pathogenic *Escherichia coli*". *J Anim Sci* 91, 5294-5306.

Liu Y., Che T.M., Bravo D., Pettigrew J.E. (2012) "Anti-inflammatory effects of several plant extracts on porcine alveolar macrophages in vitro". *J Anim Sci* 90, 2774-2783.

Loew D., Möllerfeld J., Schrödter A., Puttkammer P., Kaszkin M. (2001) "Investigations on the pharmacokinetic properties of *Harpagophytum* extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo". *Clin Pharmacol Ther* 69, 356-364.

Manda-Handzlik A., Demkow U. (2015) "Neutrophils: The role of oxidative and nitrosative stress in health and disease". *Adv Exp Med Biol* 857, 51-60.

Nastasijević B., Lazarević-Pašti T., Dimitrijević-Branković S., Pašti I., Vujačić A., Joksić G., Vasić V. (2012) "Inhibition of myeloperoxidase and antioxidative activity of *Gentiana lutea* extracts". *J Pharm Biomed Anal* 66, 191-196.

Netter P., Bannwarth B., Royer-Morrot M.J. (1989) "Recent findings on the pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in synovial fluid". *Clin Pharmacokinet* 17, 145-162.

Parij N., Nagy A.-M., Fondou P., Nève J. (1998) "Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of human neutrophils". *Eur J Pharmacol* 352, 299-305.

Tsumbu CN, Deby-Dupont G, Tits M, Angenot L, Frederich M, Kohnen S, Mouithys-Mickalad A, Serteyn D, Franck T. (2012) "Polyphenol content and modulatory activities of some tropical dietary plant extracts on the oxidant activities of neutrophils and myeloperoxidase". *Int J Mol Sci* 13, 628-650.

Varga Z., Ujhelyi L., Kiss A., Balla J., Czompa A., Antus S. (2004) "Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity and apoptosis in human neutrophils". *Phytomedicine* 11, 206-212.

van Wyk B.E. (2008) "A broad review of commercially important southern African medicinal plants". *J Ethnopharmacol* 119, 342-345.

INDAGINE SULLE PERDITE PRE- E POST-MACELLAZIONE: IL CASO DI UN MACELLO DI SUINI PESANTI

SURVEY ON ANTE- AND POST-MORTEM ANIMAL LOSSES: THE CASE OF AN ITALIAN HEAVY PIG ABATTOIR

NANNONI E.¹, LIUZZO G.², SERRAINO A.¹, GIACOMETTI F.¹, MARTELLI G.¹,
SARDI L.¹, VITALI M.¹, ROMAGNOLI L.², MOSCARDINI E.², DE LUCIA A.¹,
OSTANELLO F.¹

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50,
40064, Ozzano Emilia (BO); ²A.U.S.L. di Modena, distretto di Carpi,
Piazzale Donatori di sangue 3, 41012, Carpi (MO)

Parole chiave: trasporto, perdite animali, impatto economico

Key words: transport, animal losses, economic impact

Riassunto

Sono stati indagati retrospettivamente i fattori di rischio associati alle perdite animali che avvengono sia ante-mortem (AM) che post-mortem (PM) e il loro impatto economico sulla produzione. Dei 3.344.730 suini pesanti inviati ad un macello della regione Emilia-Romagna nel periodo aprile 2009 – dicembre 2013, 1780 capi (0,053%) sono stati persi AM (in particolare durante il trasporto o la sosta pre-macellazione; 56,6% e 39,1%, rispettivamente) e 1854 sono stati persi PM (carcasse giudicate non idonee al consumo). L'impatto economico stimato delle perdite (AM+PM) è stato di 862.000 €. La percentuale di partite di macellazione con almeno una perdita AM aumenta nei mesi estivi ($P<0,001$) nonché quando il viaggio dura più di 90 minuti ($P<0,001$), ed è positivamente correlata alla durata del trasporto ($P<0,01$). Le perdite AM più elevate ($P<0,01$) sono state registrate nelle partite trasportate a densità (definita come numero di animali per camion) inferiori (verosimilmente quando venivano trasportati suini più pesanti). Le partite con ordini di macellazione più bassi (corrispondenti a tempi di attesa prolungati) hanno avuto perdite AM più elevate ($P<0,001$). Il rischio di avere almeno una perdita AM è risultato 1,32 volte più elevato per le partite macellate in estate; 1,54 volte più elevato per viaggi di durata superiore ai 90 min.; 1,25 volte più elevato per le partite con basso ordine di macellazione, e non influenzato dalla densità durante il trasporto.

Abstract

A retrospective observational study evaluated the risk factors for pre-slaughter losses occurring both ante-mortem (AM) and post-mortem (PM) and their economic impact in Italian heavy pigs production, following the case-study of a single abattoir. Of the 3,344,730 pigs transported, 1780 (0.053%) were lost AM (either during transport -56.6%- or during lairage -39.1%) and 1838 were lost PM (carcass condemnations). The estimated economic impact of AM and PM losses was of 862,000 €. The percentage of batches with at least one animal lost AM increased during summer ($P<0.001$), it was higher when journey lasted more than 90 min. ($P<0.001$), and was positively correlated with transport duration ($P<0.01$). Losses were higher ($P<0.01$) in batches transported at low stocking densities (defined as animals loaded on a truck - i.e., when heavier pigs were transported). Batches with lower slaughtering order (i.e., longer lairage time) had higher proportions of AM losses ($P<0.001$). Logistic regression analysis showed that the odds of a given batch to have at least one animal lost AM were 1.32 times higher for batches slaughtered in summer, 1.54 times higher if journey durations exceeded 90 min., 1.25 times higher for batches with low slaughtering order, and not significantly influenced by stocking density during transport.

INTRODUZIONE

Il trasporto degli animali al macello rappresenta un'attività critica sia per il benessere animale, sia per le eventuali perdite economiche (Averós et al., 2008). Le perdite di animali sono un problema multifattoriale che coinvolge aspetti genetici, di management e gestione degli animali, di progettazione (delle strutture, dei camion e del macello di destinazione) e fattori ambientali. Comprendere gli effetti che ognuno di questi fattori (e la loro interazione) esercita sul benessere animale richiede uno sforzo continuo (Ritter et al., 2009). Paesi diversi possono differire per requisiti normativi (es. durata del trasporto o intervalli di riposo), condizioni delle strade, tipologia dei mezzi di trasporto, genetica degli animali, condizioni climatiche estreme (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). Tuttavia, nonostante le differenze, i principi generali restano invariati. Ad esempio, le perdite durante il trasporto tendono ad essere maggiori nella stagione estiva e nei suini trasportati nei compartimenti frontali e più vicini al manto stradale (Brown et al., 2011; Christensen e Barton-Gade, 1999) e la riduzione della densità di carico può migliorare il benessere degli animali (Gerritzen et al., 2013).

In Italia, i requisiti imposti dai disciplinari produttivi dei principali prosciutti stagionati richiedono la macellazione di suini di peso più elevato rispetto alla media mondiale. E' stato ipotizzato che trasportando suini di elevato peso vivo si possano avere perdite più consistenti durante il trasporto, poiché la risposta metabolica e l'aumento della temperatura rettale in questi animali sarebbe maggiore (Ellis e Ritter, 2005). Tuttavia, a nostra conoscenza, un solo studio (Vitali et al., 2014) ha analizzato i fattori associati alla mortalità dei suini pesanti italiani durante il trasporto e l'attesa pre-macellazione.

Le perdite che si verificano durante l'attesa pre-macellazione possono avvenire a causa di stress dovuti all'ambiente non familiare, al digiuno e al mescolamento di gruppi eterogenei di animali (Brandt e Aasling, 2015; Warris, 2003). Ulteriori perdite possono verificarsi dopo la macellazione, quando porzioni o intere carcasse vengono giudicate non idonee al consumo e inviate alla distruzione. Un recente studio portoghese (Garcia-Diez e Coelho, 2014) ha individuato come principali cause di perdite post-macellazione osteomieliti, pleuriti/polmoniti, linfadeniti granulomatoze, ascessi e peritoniti.

La raccolta di dati relativi alle perdite pre- e post-macellazione può costituire la base per studi riguardanti il benessere animale, le perdite economiche, le patologie e le cause principali di distruzione parziale o totale delle carcasse. Ciononostante, anche su questi aspetti le informazioni disponibili sono estremamente scarse (Garcia-Diez e Coelho, 2014).

In questo studio sono stati valutati retrospettivamente i dati di macellazione di circa 5 anni di attività di uno stabilimento operante nella Regione Emilia-Romagna al fine di:

- a) descrivere l'attività del macello, in termini di numero di animali macellati, provenienza geografica, distanza percorsa, ecc.);
- b) descrivere ed analizzare l'entità e le cause delle perdite animali, sia *ante-mortem* (AM, durante il trasporto e l'attesa pre-macellazione) che *post-mortem* (PM, dovute a distruzione delle carcasse giudicate non idonee al consumo);
- c) analizzare i fattori di rischio associati alle perdite animali (ad es. durata del trasporto, stagione, densità);
- d) stimare l'impatto economico delle perdite, con particolare riferimento a quelle AM, in quanto maggiormente correlate a fattori che agiscono durante le fasi di trasporto e di sosta e quindi potenzialmente riducibili attraverso l'implementazione di misure che coinvolgono esclusivamente queste fasi, comuni a tutti gli animali, a prescindere dall'allevamento di origine.

MATERIALI E METODI

Raccolta dei dati

Lo studio è stato condotto presso un macello situato nella provincia di Modena. L'impianto macella oltre 780.000 suini all'anno, quasi unicamente suini pesanti destinati alla produzione di prosciutti DOP (Consorzio del Prosciutto di Parma, 1992).

I dati raccolti fanno riferimento al periodo 10 aprile 2009 – 31 dicembre 2013 (circa 57 mesi di attività), e provengono dal database aggiornato dai veterinari dell'Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) di Modena incaricati della vigilanza sanitaria presso lo stabilimento di macellazione.

Dal database sono stati ricavati, per ogni partita di macellazione, i seguenti dati:

- giorno della settimana e mese di macellazione;
- Provincia e Regione di provenienza: ricavata dal codice di allevamento;
- numero di suini introdotti per partita: ricavato sommando al numero di carcasse ispezionate il numero di animali distrutti alla visita AM;
- numero totale di capi/carcasse persi: ricavato sommando il numero di animali distrutti alla visita AM e alla ispezione PM;
- durata del trasporto (in minuti): è stata ricavata utilizzando un applicativo WEB (www.viamichelin.it) ponendo come punto di partenza il capoluogo della Provincia di provenienza della partita e come punto di arrivo il Comune all'interno del quale è situato l'impianto di macellazione. La durata del viaggio è stata quindi stimata in maniera approssimativa ma omogenea per tutte le provenienze.

Allo scarico in macello, i veterinari ufficiali hanno ispezionato lo stato di salute degli animali e le condizioni di trasporto (es. la densità di carico), per assicurare il rispetto dei requisiti comunitari per il trasporto dei suini (EC, 2005).

Analisi statistica

In via preliminare, i dati sono stati analizzati in modo descrittivo allo scopo di valutare i principali indicatori di attività dello stabilimento quali il numero complessivo di suini introdotti, la loro provenienza geografica, la dimensione media della partita, le perdite AM e PM sia in termini assoluti, sia in funzione di altre variabili indipendenti (anno, stagione, giorno della settimana, ecc.).

Successivamente è stata valutata l'eventuale associazione tra le perdite AM, PM e totali (AM+PM) e altre variabili quali: anno, durata del viaggio, mese o stagione di macellazione, ordine di macellazione e dimensioni della partita. In alcuni casi, le analisi sono state effettuate dicotomizzando i valori della variabile indipendente in base al valore della mediana (90 min. per la durata del trasporto, 12 per l'ordine di macellazione).

In una seconda fase, per stimare l'influenza dei fattori di rischio sulla probabilità che una partita di macellazione avesse almeno una perdita AM, i fattori con $P < 0,15$ sono stati analizzati utilizzando un modello logistico.

Per le variabili qualitative i confronti sono stati realizzati utilizzando il test del chi-quadrato mentre per quelle quantitative, previa valutazione della normalità campionaria, sono stati impiegati i test U di Mann-Whitney o H di Kruskal-Wallis. Analogamente, per le analisi di correlazione è stato utilizzato il coefficiente di correlazione non parametrico di Spearman. Tutte le analisi sono state condotte utilizzando il software IBM SPSS ver. 21.

RISULTATI

Animali e loro origine

Nel periodo 10 aprile 2009 – 31 dicembre 2013 sono state macellate 26.635 partite di suini pesanti, distribuite in 1.059 giorni lavorativi (media: 25 partite/giorno), per un totale di 3.344.730 suini (media: 3.158/giorno). Le partite provenivano da 1.896 allevamenti; tuttavia, circa il 50% degli animali derivava da 88 aziende. Nel complesso, il numero medio di capi macellati al mese è pari a circa 60.000, con andamenti simili nei diversi anni e costante al variare dei giorni della settimana (con l’unica eccezione del giovedì, quando il macello è operativo per mezza giornata lavorativa).

Gli animali provenivano per la maggior parte (88,9% dei capi e 89,4% delle partite) dall’Emilia-Romagna o da Regioni limitrofe (Piemonte e Lombardia), entro un raggio di 250 km dall’impianto di macellazione.

Perdite complessive e stima dell’impatto economico

Durante lo studio, un totale di 1.780 capi (0,053% dei suini introdotti) sono stati persi AM. Considerando un peso vivo (PV) medio di 160 Kg, le perdite AM ammontano a 284.800 Kg. Fra le carcasse, 1.834 (corrispondenti al 51% delle perdite totali) sono state giudicate non idonee al consumo e avviate alla distruzione. Le perdite totali (AM+PM) ammontano quindi a 3.614 capi o carcasse.

Per i suini da macello di 160-176 Kg, le serie storiche della Borsa Merci di Modena (<http://www.borsamercimodena.it>) riportano, nel periodo di riferimento, quotazioni variabili da un minimo di 1,26 a un massimo di 1,75 €/Kg PV, con un prezzo medio di 1,49€/Kg nell’ultimo anno dello studio (2013). E’ possibile quindi stimare approssimativamente l’entità economica delle perdite da distruzione di capi e carcasse in circa 862,000€ nell’intero periodo. Le sole perdite AM incidono invece per circa 424.000 €, corrispondenti allo 0,053% del valore economico degli animali inviati al macello nel periodo considerato. Questa cifra non tiene in considerazione le perdite PM, la perdita economica derivante dal fatto che una buona quota delle carni sia destinata alla produzione di prodotti ad alto valore aggiunto, come i prosciutti stagionati, e i costi di smaltimento.

Perdite AM

In 1.523 delle 26.635 partite macellate (5,7%), almeno un suino era stato perso AM; all’interno di questa categoria, solo nel 10,1% delle partire le perdite AM superavano i 2 capi (Fig. 1). In un singolo caso, nel 2012, 32 capi sono stati trovati morti allo scarico a causa di una grave negligenza del trasportatore. Le ragioni delle perdite AM sono note per 1.364 dei 1.780 capi (76,6%), ed erano dovute principalmente al trasporto (56,6% delle perdite AM) e alla sosta pre-macellazione (39,1%), mentre una piccola percentuale (1,7%) è stata sottoposta ad eutanasia. Per il restante 3%, non è stato possibile stabilire se il decesso era avvenuto sul camion o nei box di sosta (Fig. 2) poiché l’informazione non era stata registrata.

La Tabella 1 riporta i dati relativi alle perdite AM in funzione della stagione, durata del trasporto, densità di animali e ordine di macellazione. I risultati indicano un aumento significativo (+1,6%) nella percentuale di partite con perdite AM macellate durante i mesi estivi (chi-quadrato=28,27; P<0,001). Le perdite AM per partita sono significativamente correlate con la durata del trasporto (rho di Spearman=0,070; P<0,01). Analizzando separatamente il periodo estivo e quello invernale si ottengono risultati molto simili. Le partite trasportate per più di 90 minuti hanno una probabilità significativamente aumentata di avere almeno una perdita AM (chi-quadrato = 74,16; P<0.001); le partite

con basso ordine di macellazione (<12, cioè quelle che restano nei box di sosta tutta la notte), hanno maggiore probabilità di avere perdite AM (chi-quadrato = 23,67; P<0,001). I risultati sono simili a quanto descritto anche se la variabile considerata è il numero di perdite AM, o il rapporto fra perdite AM e animali ricevuti dal macello per partita (Tab. 2). Le differenze sono statisticamente significative anche in questo caso per la stagione (U di Mann–Whitney = 87.232.898; P<0,001 e U = 87.235.611; P<0,001, per le due variabili), confermando l’aumento delle perdite AM durante i mesi estivi. Si conferma anche come le perdite AM siano significativamente più elevate quando il viaggio dura più di 90 minuti (U = 86.448.609; P<0,001 e U = 86.411.823; P<0,001, rispettivamente) e per partite con basso ordine di macellazione (U = 87.225.794; P <0,001 e U = 87.226.022; P<0,001, rispettivamente).

Per quanto riguarda le perdite AM in relazione alla densità durante il trasporto, inaspettatamente la probabilità di avere perdite AM è più elevata quando la densità di animali durante il trasporto è bassa (chi-quadrato= 7,59; P <0,01, Tab. 1). I dati riportati nella tabella 2 confermano questo andamento anche per i valori quantitativi (U = 87.976.426; P <0,01 e U = 87.782.870, P <0,001).

I risultati dell’analisi di regressione logistica sono riportati in tabella 3. Il rischio per una partita di macellazione di avere almeno una perdita AM è 1,32 volte più elevato per le partite macellate nella stagione estiva, 1,54 volte più elevato per viaggi di durata superiore a 90 min. e 1,25 volte più elevato per le partite con basso ordine di macellazione (attesa prolungata). La densità elevata di animali sul camion non incrementa il rischio di avere almeno una perdita AM.

Figura 1. Distribuzione di frequenza del numero di animali distrutti AM per partita. Le percentuali sono calcolate sulle partite con almeno una perdita AM.

Figure 1. Frequency distribution of the absolute number of animals lost AM per batch. Percentages are calculated within batches with at least one animal lost AM.

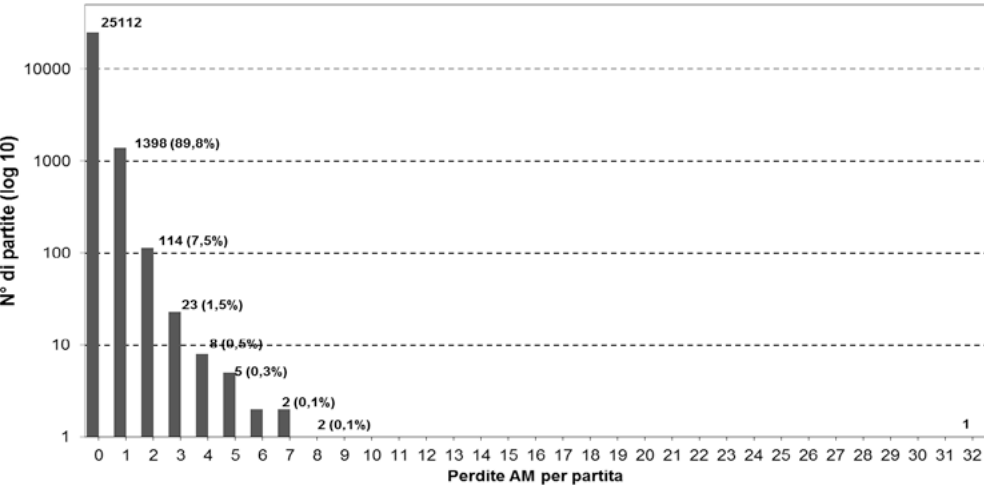


Figura 2. Perdite AM (con relative cause) e PM. Totale perdite AM+PM=3.614 (0,11% dei capi trasportati).

Figure 2. Losses occurred both AM (with their causes) and PM. Total losses AM+PM=3.614 (0,11% of pigs transported).

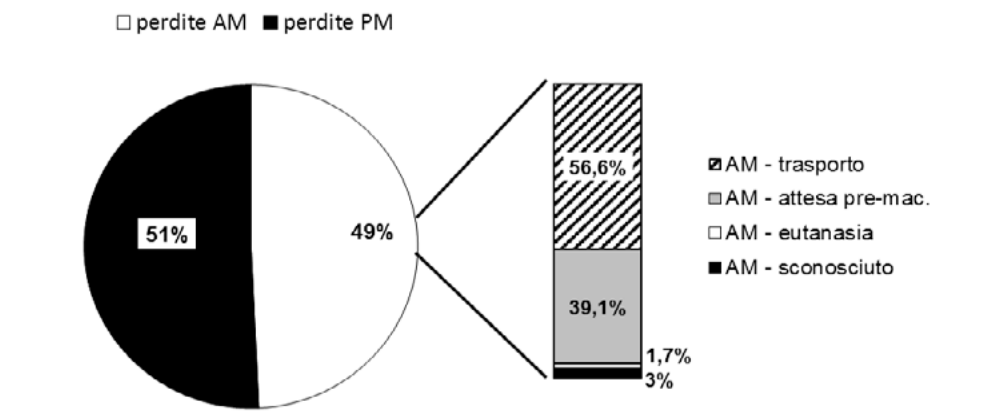


Tabella 1. Partite con perdite AM in funzione di stagione, durata del trasporto, ordine di macellazione e densità di animali durante il trasporto.

Table 1. Number of batches with AM losses in function of season, journey duration, slaughtering order and density during transport.

		Partite con almeno un capo perso AM (%)			
		sì (%)	no (%)	Totale	P
Stagione	Estate (Apr.-Sett.)	886(6,5)	12.848 (93,5)	13.734	<0,001
	Inverno (Ott.-Mar.)	637 (4,9)	12.264 (95,1)	12.901	
Ordine di macellazione ^a	1-12	815 (6,4)	11.828 (93,6)	12.643	<0,001
	>12	708 (5,1)	13.284 (94,9)	13.992	
Durata del trasporto	>90 min	943 (6,9)	12.696 (93,1)	13.639	<0,001
	<90 min	580 (4,5)	12.416 (95,5)	12.996	
Densità ^b	Bassa	811 (6,1)	12.459 (93,9)	13.270	0,006
	Alta	712 (5,3)	12.653 (94,7)	13.365	
Totale		1.523 (5,7)	25.112 (94,3)	26.635	

^a ordine di macellazione: numero progressivo attribuito a ogni partita all’arrivo. Valori bassi corrispondono a partite che hanno raggiunto l’impianto la sera prima della macellazione, hanno trascorso la notte nei box di attesa pre-macellazione e sono state macellate per prime il giorno successivo.

^b densità durante il trasporto: la densità è stata dicotomizzata sulla base del valore della mediana. Sono state definite “ad alta densità” quelle partite in cui venivano trasportati oltre 71 suini su di un singolo camion, o più di 140 su di un camion + rimorchio.

^a slaughtering order: a progressive number attributed to every batch upon arrival. Lower values correspond to batches of pigs who reached the slaughterhouse on the day before slaughtering, spending the night in lairage and being the first slaughtered on the day after their arrival.

^b stocking density during transport was dichotomized according to median animal numerosity. “high density during transport” batches were defined as all batches above 71 pigs transported by the same trailer or all batches above 140 pigs (in this case a second trailer was used).

Tabella 2. Media delle perdite AM e rapporto con gli animali ricevuti dal macello in funzione di stagione, durata del trasporto, ordine di macellazione e densità durante il trasporto (totale partite: 26.635; partite con almeno una perdita AM: 1.523; animali ricevuti dal macello: 3.344.730).

Table 2. Mean of pigs lost pre-slaughtering (PS) and rate of animals lost PS according to season, median of journey duration, slaughtering order and density during transport (total no. of batches: 26,635; no. of batches with at least one animal lost PS: 1,523; pigs received: 3,344,730).

		Perdite AM (num. capi)	Media perdita AM per partita	P	Perdite AM / 1000 animali ricevuti dal macello	P
Stagione	Estate (Apr.-Sett.)	1048	0,08	<0,001	0,59	<0,001
	Inverno (Ott.-Mar.)	732	0,06		0,45	
Ordine di macellazione	1-12	1122	0,08	<0,001	0,64	<0,001
	≥12	658	0,05		0,40	
Durata del trasporto	>90 min	937	0,07	<0,001	0,58	<0,001
	<90 min	843	0,06		0,47	
Densità	Bassa	946	0,07	<0,01	0,59	<0,001
	Alta	834	0,06		0,46	
Totale		1780	0,07		0,53	

Tabella 3. Risultati della regressione logistica in funzione di stagione, durata del trasporto, ordine di macellazione e densità di animali durante il trasporto.

Table 3. Logistic regression analysis according to season, journey duration, slaughtering order and density during transport.

			IC 95% per Odds ratio		P
			Limite inferiore	Limite superiore	
		Odds ratio			
Stagione	Estate (Apr.-Sett.)	1,32	1,19	1,47	<0,001
Durata del trasporto	>90 min	1,54	1,38	1,72	<0,001
Ordine di macellazione	≥12	1,26	1,13	1,39	<0,001
Densità	Alta	0,94	0,84	1,04	0,228
Costante		11,103			<0,001

DISCUSSIONE

Il valore medio di perdite AM osservato nel presente studio (0,053%) è considerevolmente più basso rispetto a quanto riportato sia in Nord America che in altri Paesi europei (0,22% negli USA, 0,11% in Canada, 0,16% in media EU, Ritter et al., 2009). La percentuale è invece più in accordo con quanto osservato recentemente in uno studio italiano (0,031%, Vitali et al., 2014). La maggior parte delle perdite AM sono avvenute durante il trasporto e la sosta pre-macellazione. La letteratura è concorde nell'indicare il trasporto come fonte di notevole stress (Pérez et al., 2002), tuttavia anche l'attesa pre-macellazione (in particolare quando si hanno mescolamento di gruppi eterogenei di animali, digiuno prolungato, microclima inadeguato, movimentazioni troppo "energetiche") può determinare non solo stress, ma anche perdite economiche dovute a decessi, traumi, ferite, lesioni delle carcasse, alterazioni della qualità della carne (Pérez et al., 2002; Warriss, 2003). Anche se le condizioni dell'attesa pre-macellazione non sono state monitorate in questo studio, è stato osservato un aumento delle perdite quando l'attesa pre-macellazione si prolungava, indicativo della possibile presenza di condizioni che riducono il benessere animale in questa fase.

E' stata inoltre osservata una forte relazione fra stagione dell'anno e perdite AM, con un aumento significativo durante i mesi estivi. Molti Autori hanno osservato come temperature elevate, soprattutto in combinazione con elevata di umidità relativa, limitino la capacità di dissipare calore corporeo da parte dei suini, aumentando il numero degli animali esausti e le perdite in questa fase (Barton Gade et al., 2007; Schwartzkopf-Genswein et al., 2012; Nannoni et al., 2014; Vitali et al., 2014).

Ulteriore causa di aumento delle perdite AM è rappresentata dalla durata del trasporto superiore ai 90 minuti. Questa osservazione è in accordo con quanto riportato da altri Autori che hanno osservato un aumento della mortalità quando i viaggi superavano i 100 km (Gosálvez et al., 2006), o quando la durata del trasporto passava da 30 min. a 4 ore (Sutherland et al., 2009). La relazione fra durata del viaggio e mortalità AM deve essere considerata con attenzione in quei Paesi, Italia compresa, in cui la macellazione dei suini si sta gradualmente concentrando in un numero ridotto di stabilimenti di grandi dimensioni, prolungando verosimilmente la durata media del trasporto.

Per quanto riguarda la densità durante il trasporto, alcuni Paesi adottano linee guida per la riduzione della densità di carico in funzione delle temperature ambientali e del peso degli animali, anche se non c'è pieno accordo in merito (Schwartzkopf-Genswein et al., 2012). In Italia non esistono linee-guida analoghe. I requisiti normativi (EC, 2005) stabiliscono unicamente che la densità di carico dei suini del peso di 100 Kg non debba superare 235 Kg/m² (per suini di 160 kg, ciò corrisponde a 0,681 m²/capo). Il Regolamento comunque riconosce come, in base alle dimensioni dei suini, alle condizioni meteorologiche e alla durata del viaggio, possa essere necessario aumentare gli spazi minimi richiesti fino al 20%. In questo studio, la densità durante il trasporto è stata definita come "alta" o "bassa" in maniera retrospettiva, sulla base del numero di animali trasportati e del tipo di camion. Con questa semplice dicotomia, è stata osservata una riduzione delle perdite AM nei trasportati ad alta densità. Questo risultato è in contrasto con quanto riportato in letteratura, poiché molti Autori hanno osservato una correlazione positiva tra densità e perdite durante il trasporto in suini fino a 130 Kg di peso (BartonGade et al., 2007; Ritter et al., 2007). Inoltre, Ritter et al. (2007) hanno osservato che in suini di 130 Kg circa, l'aumento dello spazio disponibile durante il trasporto riduce la mortalità solo fino ad una certa soglia (0,462 m²/capo), mentre non si ottengono effetti aggiuntivi se lo spazio viene ulteriormente aumentato (0,489 o 0,520 m²/capo).

A nostra conoscenza, non esistono studi che abbiano indagato la relazione fra la densità e la mortalità durante il trasporto del suino pesante, e l'unica ricerca sul suino pesante (Vitali et

al., 2014) non considera la densità durante il trasporto ma solo quella durante l'attesa pre-macellazione. Alcuni studi hanno mostrato come la disponibilità eccessiva di spazio durante il trasporto possa peggiorare il benessere (gli animali possono essere sbalzati da movimenti inaspettati del camion e ferirsi, secondo Barton Gade e Christensen, 1998) e la qualità delle carni (secondo Guàrdia et al., 2005, se gli animali possono camminare per il camion sono più a rischio di lotte e fatica muscolare, con aumento del rischio di carni DFD). E' comunque bene rilevare che la definizione retrospettiva di densità durante il trasporto utilizzata per questo studio (numero di animali caricati su ogni veicolo) potrebbe aver creato qualche effetto confondente. Infatti, secondo la nostra definizione, la "bassa densità" corrispondeva a un numero inferiore di animali trasportati sul camion, indipendentemente dal loro peso vivo. Considerando che i suini pesanti vengono generalmente macellati ad un peso che varia fra i 155 e i 176 Kg, e che la densità massima di legge è espressa in Kg/m², è ragionevole attendersi che i trasporti a bassa densità di animali abbiano coinvolto suini più pesanti, che sono più suscettibili a risposte metaboliche estreme quando movimentati e trasportati (Ellis e Ritter, 2005). Infine è bene ricordare anche che la regressione logistica non ha mostrato un aumento significativo del rischio di avere almeno una perdita AM nei trasporti a bassa densità.

L'impatto economico dei soli capi persi AM ammonta allo 0,053% del valore commerciale dei capi macellati e corrisponde a 0,13 € per ogni capo macellato. Considerando una media di 3.158 macellazioni/giorno è possibile stimare una perdita giornaliera di circa 400 €. Questo valore può rappresentare un parametro valido per valutare l'efficacia degli interventi volti alla riduzione delle perdite AM (come miglioramento delle condizioni durante il trasporto, e riduzione dei tempi di attesa pre-macellazione).

Oltre alle perdite AM, se le condizioni che si verificano durante il trasporto e l'attesa pre-macellazione non sono idonee, possono realizzarsi perdite economiche aggiuntive (Ritter et al., 2009). Le carcasse di animali feriti o non deambulanti devono essere toelettate, con conseguente perdita di porzioni edibili e incremento delle manodopera necessaria. Inoltre, l'impianto di macellazione affronta dei costi aggiuntivi sia per distruggere le carcasse non destinate al consumo, sia per movimentare in maniera corretta gli animali non deambulanti o feriti. Infine, gli animali stressati, affaticati o esausti sono in uno stato di acidosi metabolica, che può alterare la qualità delle carni rendendole pallide, soffici ed essudative (PSE) oppure scure, dure e asciutte (DFD) in base al momento della pre-macellazione in cui si mobilitano le riserve di glicogeno muscolare (Fortin, 2002; Ritter et al., 2009).

Infine, una ulteriore consistente perdita economica è dovuta al fatto che le carni di suino pesante sono destinate alla produzione di specialità ad elevato valore aggiunto (come ad esempio il Prosciutto di Parma). Secondo stime recenti (De Roest et al., 2014), il valore aggiunto nel periodo 2009-2013 equivale a 0,42€ per Kg di coscia fresca.

CONCLUSIONI

Questo studio ha permesso di identificare alcuni fattori di rischio relativi alle perdite AM del suino pesante, e di quantificare l'impatto economico di tali perdite. Alcuni fattori di rischio sono simili a quanto descritto per suini più leggeri (viaggi lunghi, elevate temperature ambientali), mentre altri fattori sono meno documentati in letteratura (bassa densità di animali durante il trasporto, prime partite macellate). Nel complesso, i fattori evidenziati possono identificare i punti critici che emergono durante il trasporto e la gestione pre-macellazione degli animali. E' degno di nota come la maggior parte dei fattori considerati nel presente studio non richieda indagini specifiche ma possa anzi essere monitorata attraverso l'analisi dei dati di trasporto e macellazione che vengono routinariamente registrati dai macelli e dai veterinari ispettori. Si auspica pertanto che, analogamente a quanto succede per i broilers (EC, 2007), la valutazione del benessere dei suini possa essere inclusa nelle future normative

per la protezione dei suini durante il trasporto e la macellazione. Infine, sarebbe di interesse approfondire l'analisi economica per valutare l'impatto delle perdite animali lungo l'intera catena produttiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Averós X., Knowles T., Brown S.N., Warriss P.D., Gosálvez, L.F. (2008) "Factors affecting the mortality of pigs being transported to slaughter" *Vet Rec* 163, 386–390.
2. Barton Gade P., Christensen L., Baltzer M., Valentin Petersen J. (2007) "Causes of pre-slaughter mortality in Danish slaughter pigs with special emphasis on transport" *Anim Welfare* 16, 459-470.
3. Barton Gade P., Christensen L. (1998) "Effect of different stocking densities during transport on welfare and meat quality in Danish slaughter pigs" *Meat Sci* 48, 237-247.
4. Brandt P., Aaslyng M.D. (2015) "Welfare measurements of finishing pigs on the day of slaughter: A review" *Meat Sci.* 103, 13-23.
5. Brown J.A., Samarakone T.S., Crowe T., Bergeron R., Widowski T., Correa J.A., Faucitano L., Torrey S., Gonyou H.W. (2011) "Temperature and humidity conditions in trucks transporting pigs in two seasons in Eastern and Western Canada" *Trans. ASABE* 54, 2311-2318.
6. De Roest K., Pignedoli S., Belletti G., Menozzi D., Arfini F. (2014) "Italian case study: local and global cured ham chains". EU Projec GLAMUR, <http://glamur.eu/wp-content/uploads/2015/04/glamur-wp3-italy-ham-3-cases.pdf>.
7. Christensen L., Barton-Gade P., (1999) "Temperature profile in double-decker transporters and some consequences for pig welfare during transport" *Occasional Publication of the British Soc. of Animal Sci.* 23, 125–128.
8. Consorzio del Prosciutto di Parma (1992) "Prosciutto di Parma, Denominazione di Origine Protetta. Disciplina Generale e Dossier", http://www.prosciuttodiparma.com/pdf/it_IT/disciplinare.28.11.2013.it.pdf.
9. European Council – EC (2005) Council Regulation (EC) No 1/2005 of 22 December 2004 on the protection of animals during transport and related operations and amending Directives 64/432/EEC and 93/119/EC and Regulation (EC) No 1255/97. *Off. J. Eur. Union:Legis3*, 1-44.
10. European Council – EC (2007) Council Directive 2007/43/EC of 28 June 2007 laying down minimum rules for the protection of chickens kept for meat production (Text with EEA relevance). *Official Journal of the European Union: Legis182*, 19-28.
11. Ellis M., Ritter M. (2005) "Transport losses: Causes and solutions" Allen D. Leman Swine Conference, University of Minnesota, <http://hdl.handle.net/11299/143195>.
12. Fortin A. (2002) "The effect of transport time from the assembly yard to the abattoir and resting time at the abattoir on pork quality" *Can. J. Anim. Sci.* 82, 141-150.
13. Garcia-Diez J., Coelho A.C. (2014) "Causes and factors related to pig carcass condemnation" *Veterinari Medicina* 59, 194-201.
14. Gerritzen M.A., Hindle V.A., Steinkamp K., Reimert H.G.M., van der Werf J.T.N., Marahrens M. (2013) "The effect of reduced loading density on pig welfare during long distance transport" *Animal* 7, 1849-1857.
15. Gosálvez L.F., Averós X., Valdevira J.J., Herranz A. (2006) "Influence of season, distance and mixed loads on the physical and carcass integrity of pigs transported to slaughter" *Meat Sci* 73, 553-558.
16. Guàrdia M.D., Estany J., Balasch S., Oliver M.A., Gispert M., Diestre, A (2005) "Risk assessment of DFD meat due to pre-slaughter conditions in pigs" *Meat Sci* 70, 709-716.
17. Nannoni E., Widowski T., Torrey S., Fox J., Rocha L.M., Gonyou H., Weschenfelder A.V., Crowe T., Martelli G., Faucitano L. (2014) "Water sprinkling market pigs in a

stationary trailer. 2. Effects on selected exsanguination blood parameters and carcass and meat quality variation" *Livest Sci* 160, 124-131.

18. Pérez M.P., Palacio J., Santolaria M.P., Aceña M.d.C., Chacón G., Verde M.T., Calvo J.H., Zaragoza M.P., Gascón M., García-Belenguer S. (2002) "Influence of lairage time on some welfare and meat quality parameters in pigs" *Vet Res* 33, 239-250.
19. Ritter M. J., Ellis M., Bertelsen C.R., Bowman R., Brinkmann J., DeDecker J.M., Keffaber K.K., Murphy C.M., Peterson B.A., Schlipf J.M., Wolter B.F. (2007) "Effects of distance moved during loading and floor space on the trailer during transport on losses of market weight pigs on arrival at the packing plant" *J Anim Sci* 85, 3454-3461.
20. Ritter M.J., Ellis M., Berry N.L., Curtis S.E., Anil L., Berg E., Benjamin M., Butler D., Dewey C., Driessen B., DuBois P., Hill J.D., Marchant-Forde J.N., Matzat P., McGlone J., Mormede P., Moyer T., Pfalzgraf K., Salak-Johnson J., Siemens M., Sterle J., Stull C., Whiting T., Wolter B., Niekamp S.R., Johnson A.K. (2009) "Review: Transport Losses in Market Weight Pigs: I. A Review of Definitions, Incidence, and Economic Impact" *Prof Anim Sci* 25, 404–414.
21. Schwartzkopf-Genswein K.S., Faucitano L., Dadgar S., Shand P., González L.A., Crowe T.G. (2012) "Road transport of cattle, swine and poultry in North America and its impact on animal welfare, carcass and meat quality: A review" *Meat Sci* 92, 227-243.
22. Sutherland M.A., McDonald A., McGlone J.J. (2009) "Effects of variations in the environment, length of journey and type of trailer on the mortality and morbidity of pigs being transported to slaughter" *Vet Rec* 165, 13-18.
23. Vitali A., Lana E., Amadori M., Bernabucci U., Nardone A., Lacetera N. (2014) "Analysis of factors associated with mortality of heavy slaughter pigs during transport and lairage" *J Anim Sci* 92, 5134-41.
24. Warriss P.D. (2003) "Optimal lairage times and conditions for slaughter pigs: a review" *Vet Rec* 153, 170-176.

ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* E *PASTEURELLA MULTOCIDA* ISOLATI NEL SUINO NEL PERIODO 2002-2016 IN ITALIA

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE* AND *PASTEURELLA MULTOCIDA* STRAINS ISOLATED DURING THE PERIOD 2002-2016 IN ITALIAN PIGS

PANGALLO G., BONILAURI P., GHERPELLI Y., DOTTORI M., DE LORENZI G., LUPPI A.

IZSLER, Sezione di Reggio Emilia

Parole chiave: Resistenza antibiotica, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*
Keywords: Antimicrobial-resistance, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*

Riassunto

In questo studio è stato valutato il tasso e il trend di resistenza nei confronti di diversi antibiotici di 354 ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* e 1058 ceppi di *Pasteurella multocida* isolati da casi di pneumopatie in suini appartenenti ad allevamenti ubicati in Nord Italia, nel periodo 2002-2016. Tutti i ceppi sono stati testati per la loro suscettibilità a 9 antibiotici impiegando il metodo della disco diffusione (Kirby-Bauer): Amoxicillina+Acido Clavulanico (20µg\10µg), Ampicillina (10µg), Cefalexina (30µg), Ceftiofur (30µg), Enrofloxacin (5µg), Florfenicolo (30µg), Lincomicina (2µg), Tetraciclina (30µg) e Trimethoprim-Sulfametossazolo (1,25µg\23,75µg). Con l'impiego di un test chi-quadrato per trend lineare è stato valutato l'eventuale trend in aumento o in diminuzione della resistenza nei confronti di ogni antibiotico nel periodo considerato. I ceppi di *A. pleuropneumoniae* hanno evidenziato, nell'intero periodo dello studio, un trend in aumento della resistenza statisticamente significativo nei confronti del Florfenicolo ($\chi^2 = 8.34$ $P < 0.01$). Al contrario, un trend di diminuzione della resistenza è stato riscontrato nei confronti del Trimethoprim+Sulfametossazolo ($\chi^2 = 5.65$ $P < 0.05$). Per quanto riguarda invece i ceppi di *P. multocida* è stato rilevato un trend di aumento della resistenza nei confronti sia della Lincomicina ($\chi^2 = 20.03$ $P < 0.01$) sia del Florfenicolo ($\chi^2 = 5.67$ $P < 0.05$).

Abstract

This study evaluated the rate and the trend of resistance to various antibiotics of 354 strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and 1058 strains of *Pasteurella multocida* from diseased pigs, belonging to herds located in Northern Italy, in the period 2002-2016. The strains were analyzed for their susceptibility to 9 antimicrobials by disk diffusion method (Kirby-Bauer): Amoxicillin+Clavulanic acid (20µg\10µg), Ampicillin (10µg), Cephalexin (30µg), Ceftiofur (30µg), Enrofloxacin (5µg), Florfenicol (30µg), Lincomycin (2µg), Tetracycline (30µg) e Trimethoprim-sulfamethoxazole (1,25µg\23,75µg). With the use of a linear trend chi-square test was evaluated the increasing or decreasing trend of resistance to each antibiotic in the period considered. The *A. pleuropneumoniae* bacterial strains showed, over the whole period of the study, a statistically significant increasing trend of resistance to Florfenicol ($\chi^2 = 8.34$ $P < 0.01$). Conversely, a statistically significant decreasing trend of resistance was observed to Trimethoprim + Sulfamethoxazole ($\chi^2 = 5.65$ $P < 0.05$). *P. multocida* strains showed an increasing trend of resistance to Lincomycin ($\chi^2 = 20.03$ $P < 0.01$) and Florfenicol ($\chi^2 = 5.67$ $P < 0.05$).

INTRODUZIONE

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) e *Pasteurella multocida* (PM) sono tra gli agenti eziologici più importanti in ambito suinicolo, responsabili di consistenti perdite economiche, dovute all'aumento della mortalità, all'uso di trattamenti terapeutici e alla diminuzione delle performance produttive. Entrambi i batteri sono Gram negativi, anaerobi facoltativi e dalla morfologia coccobacillare. Gli isolati di APP sono suddivisi in biotipo 1 e biotipo 2, in base alla loro dipendenza dal NAD per la crescita (rispettivamente NAD-dipendente e NAD- non dipendente) e in 15 sierotipi diversi (1-12, 15 per APP biotipo 1; 13, 14 per APP biotipo 2), in base alle caratteristiche dei polisaccaridi capsulari e dell'LPS (Blackall et al., 2002; Kamp et al., 1987; Nielsen 1985a, b, 1986b; Nielsen et al., 1997; Nielsen and O'Connor, 1984; Rosendal and Boyd, 1982). I ceppi di APP sono produttori di 4 tossine differenti chiamate "APX". APX I è fortemente emolitica e citotossica, APX II è debolmente emolitica e citotossica, APX III non è emolitica ma fortemente citotossica e APX IV che sembrerebbe svolgere funzioni di completamento dell'espressione della virulenza del patogeno (Frey et al. 1994; Jansen et al., 1995), sebbene il suo ruolo non sia stato ancora completamente chiarito. Nel suino, APP è causa di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, anche se la gravità della malattia è determinata oltre a fattori legati all'ospite e all'ambiente, alla virulenza del ceppo coinvolto. A questo proposito non sono infrequenti forme sub-cliniche della malattia che si traducono in casi caratterizzati da bassa o assente mortalità con frequente cronicizzazione delle lesioni pleuropolmonari, rilevabili sottoforma di pleuriti fibrose o croniche, a localizzazione dorso-caudale, in animali regolarmente macellati. PM si comporta come patogeno secondario, come complicante di precedenti infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae* o forme virali sostenute da PRRSV o virus influenzali. Gli isolati di *P. multocida* possono essere raggruppati in 5 sierotipi (A, B, D, E, F) fra i quali l'A e il D sono quelli più frequentemente isolati dai suini con forme respiratorie, mentre il sierotipo D è responsabile della rinite atrofica (Carter 1955; Rimler and Rhoades, 1987). Attualmente gli strumenti di controllo di queste patologie sono, quando disponibili come nel caso di *A. pleuropneumoniae*, l'impiego di vaccini e la somministrazione di farmaci antibiotici. Da diversi anni viene rivolta sempre più attenzione al fenomeno dell'antibiotico resistenza (European Commission, 2011; World Health Organization, 2014), un fenomeno naturale favorito dall'abuso o dal non corretto utilizzo dell'antibiotico (European Commission, 2011; Van Boeckel et al., 2015). Le terapie di massa a scopo terapeutico e profilattico/metafilattico sono il principale fattore di rischio per l'insorgenza di fenomeni di antibiotico resistenza, a causa del possibile sottodosaggio a cui sono sottoposti gli animali (mancato rispetto della posologia e dei tempi terapeutici) sia per cause accidentali sia volontarie. La resistenza antimicrobica è spesso associata alla continua pressione esercitata dagli antibiotici a cui è esposta la popolazione batterica, la quale determina la selezione di ceppi batterici resistenti alle molecole impiegate (Dayao et al., 2015).

Nella maggior parte degli studi eseguiti su ceppi di APP e PM in Europa è stato osservato che la maggior parte degli isolati era sensibile nei confronti dei fluorochinoloni, ceftiofur, florfenicolo, amoxicillina + acido clavulanico e trimethoprim+sulfametossazolo, mentre elevati livelli di resistenza sono stati riportati nei confronti delle tetracicline (Jong et al., 2014). Nel presente studio si riportano i dati relativi alla sensibilità di 354 ceppi di APP e 1058 ceppi di PM, nei confronti di 9 molecole antibiotiche, isolati da casi di pleuropolmonite e broncopolmonite catarral-purulenta nel periodo 2002-2016, al fine di valutarne la situazione attuale e monitorare il trend degli ultimi 15 anni, finalizzati all'indirizzo terapeutico.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Nel presente studio sono stati inclusi 354 ceppi di *A. pleuropneumoniae* (biotipo 1 e 2) e 1058 ceppi di *P. multocida* isolati durante la routinaria attività diagnostica dell'Istituto

Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia-Romagna (IZSLER), sezione di Reggio Emilia, nel periodo 2002-2016. I ceppi batterici in esame sono stati isolati da polmoni prelevati da suini appartenenti ad allevamenti del Nord Italia, i quali presentavano lesioni riferibili a pleuropolmoniti fibrino-necrotico-emorragiche e bronco-polmoniti catarrali e catarral-purulente. Queste matrici sono state utilizzate per l'esame batteriologico attraverso la semina su 3 differenti terreni: agar siero, agar Gassner e agar sangue addizionato con Nicotinammide adenina dinucleotide (NAD). La successiva incubazione è avvenuta a 37°C per 48 ore, in aerobiosi per le piastre di agar siero e di agar Gassner e in termostato a CO₂ per l'agar sangue addizionato con NAD. La crescita delle colonie è stata valutata a 24 e 48 ore post semina. La crescita dei patogeni oggetto del presente lavoro è stata confermata con l'impiego di metodi biochimici e sierologici standardizzati. Non sono stati inclusi, per ogni anno considerato, più di due ceppi provenienti dallo stesso allevamento. Le molecole antibiotiche sono state suddivise arbitrariamente in tre categorie sulla base della loro attività antimicrobica media durante tutto il periodo considerato: gruppo I (percentuale di ceppi resistenti ≤ 30%), gruppo II (percentuale di ceppi resistenti compresa tra 31% e 60%) e gruppo III (percentuale di ceppi resistenti ≥ 61%).

Resistenza agli antibiotici

I ceppi di APP e PM inclusi nello studio sono stati testati per valutarne la resistenza nei confronti di 9 molecole antibiotiche: Amoxicillina+Acido Clavulanico (20µg\10µg), Ampicillina (10µg), Cefalexina (30µg), Ceftiofur (30µg), Enrofloxacin (5µg), Florfenicolo (30µg), Lincomicina (2µg), Tetraciclina (30µg) e Trimethoprim-Sulfametossazolo (1,25µg\23,75µg). L'antibiogramma, tramite disco diffusione (metodo Kirby Bauer) è stato eseguito seguendo gli standard forniti dal Clinical Laboratory Standard Institute e valutato secondo le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute (Clinical Laboratory Standard Institute, 2008; NCCLS, 2003; NCCLS, 2004 e CASFM 2010). Per ogni antibiotico utilizzato, gli antibiogrammi hanno fornito un risultato qualitativo espresso come "S", "I", "R" (rispettivamente sensibile, intermedio, resistente), a seconda della risposta batterica all'azione delle varie molecole antimicrobiche. 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

Ai fini statistici i ceppi intermedi sono stati raggruppati con quelli resistenti e considerati quindi non sensibili. Il tasso di resistenza dei ceppi batterici inclusi nello studio nei confronti di ciascun antibiotico è stato calcolato, per ogni anno, eseguendo il rapporto tra i ceppi risultati non sensibili (intermedi + resistenti) e il numero di ceppi testati nei confronti di un dato antibiotico. Con 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 resistenza nei confronti di ogni antibiotico nel periodo considerato. Le differenze sono state considerate statisticamente significative con $P < 0.05$.

RISULTATI

Il tasso di resistenza dei ceppi di APP e PM, isolati tra il 2002 e il 2016, nei confronti di ogni antimicrobico impiegato nello studio sono riportati, rispettivamente, in tabella 1 e 2. Seguendo i criteri sopraccitati, i ceppi di APP sono stati suddivisi in tre gruppi: al gruppo I (resistenze ≤ 30%) appartengono l'Amoxicillina+Acido Clavulanico, la Cefalexina, il Ceftiofur, l'Enrofloxacin e il Florfenicolo; al gruppo II (percentuale di ceppi resistenti compresa tra 31% e 60%) il Trimethoprim+Sulfametossazolo, le Tetracicline e l'Ampicillina; al gruppo III (percentuale di ceppi resistenti ≥ 61%) la Lincomicina. Seguendo gli stessi criteri anche per i ceppi di PM è stato osservato che tutti gli antibiotici ricadono nel gruppo

I ad eccezione delle Tetracicline (gruppo II) e della Lincomicina (gruppo III). L'analisi statistica dei dati riportati in tabella 1 e 2, evidenzia nell'intero periodo considerato, per i ceppi di APP, un trend di diminuzione della resistenza nei confronti di Trimethoprim+Sulfametossazolo ($\chi^2 = 5.65$ $P < 0.05$). Al contrario, un trend di aumento della resistenza è stato riscontrato nei confronti del Florfenicolo ($\chi^2 = 8.34$ $P < 0.01$) (Fig.1). Per quanto riguarda invece i ceppi di PM si rileva un trend di aumento della resistenza nei confronti sia della Lincomicina ($\chi^2 = 20.03$ $P < 0.01$) sia del Florfenicolo ($\chi^2 = 5.67$ $P < 0.05$) (Fig. 2).

Fig.1: Trend di resistenza dei ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* al Florfenicolo e al Trimethoprim+Sulfametossazolo nel periodo 2002-2016

Fig.1: Trend of resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains for Florfenicol and Trimethoprim+Sulfamethoxazole in the period 2002-2016)

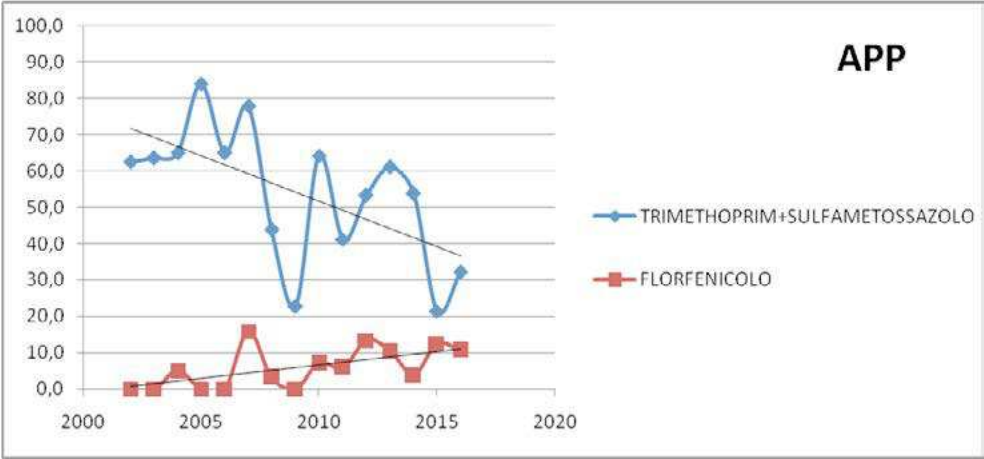
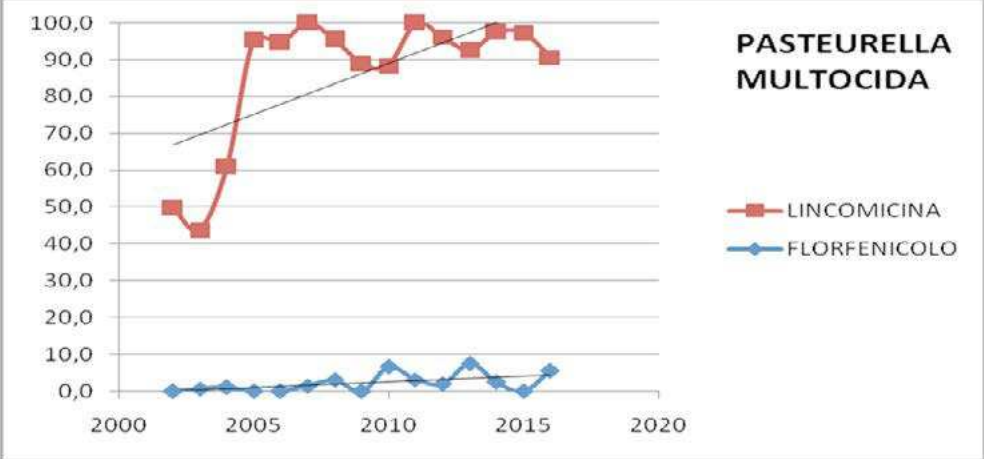


Fig.2: Trend di resistenza dei ceppi di *Pasteurella multocida* al Florfenicolo e alla Lincomicina nel periodo 2002-2016

Fig.2: Trend of resistance of *Pasteurella multocida* strains for Florfenicol and Lincomycin in the period 2002-2016



Tab.1: Percentuale di ceppi di *Actinobacillus pleuropneumoniae* risultati resistenti ai diversi antibiotici oggetto di studio nel periodo 2002-2016

Tab.1: Percentage of resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to the antibiotics included in the study in the period 2002-2016

<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>																	
% RESISTENZA PER ANNO																	
MOLECOLE ANTIBIOTICHE	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	P	
AMOXICILLINA + AC.CLAVULANICO	5,0	15,9	0,0	12,0	0,0	26,3	16,7	22,7	28,6	6,7	8,3	16,7	12,5	7,7	4,2	N.S.	
AMPICILLINA	66,7	75,0	55,0	44,0	55,0	68,4	61,3	81,8	64,3	64,7	33,3	63,2	76,9	60,0	50,0	N.S.	
CEFALOSPORINE 1° GEN. (CEFALEXINA)	43,9	18,2	15,0	28,0	15,0	38,9	56,3	22,7	50,0	11,8	21,4	5,3	33,3	20,0	25,9	N.S.	
CEFALOSPORINE 3° GEN. (CEFTIOFUR)	18,4	22,7	0,0	28,0	10,0	26,3	34,4	18,2	42,9	11,8	20,0	10,5	15,4	8,3	19,2	N.S.	
ENROFLOXACIN	23,8	15,9	5,0	24,0	10,0	31,6	40,6	13,6	35,7	11,8	40,0	21,1	34,6	6,3	35,7	N.S.	
FLORFENICOLO	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	15,8	3,1	0,0	7,1	5,9	13,3	10,5	3,8	12,5	10,7	<0,05	
LINCOMICINA	92,1	90,9	95,0	96,0	100,0	100,0	96,9	94,7	100,0	100,0	100,0	94,7	100,0	100,0	100,0	N.S.	
TETRACICLINA	75,6	75,0	25,0	44,0	60,0	57,9	75,0	63,6	64,3	52,9	66,7	36,8	57,7	37,5	50,0	N.S.	
TRIMETHOPRIM + SULFAMETOSSAZOLO	62,5	63,6	65,0	84,0	65,0	77,8	43,8	22,7	64,3	41,2	53,3	61,1	53,8	21,4	32,1	<0,05	
CAMPIONI ESAMINATI	40	44	20	25	20	19	32	22	14	17	15	19	25	14	28	-	

Tab.2: Percentuale di ceppi di *Pasteurella multocida* risultati resistenti ai diversi antibiotici oggetto di studio nel periodo 2002-2016

Tab.2: Percentage of resistance of *Pasteurella multocida* strains to the antibiotics included in the study in the period 2002-2016

<i>Pasteurella multocida</i>																	
% RESISTENZE PER ANNO																	
MOLECOLE ANTIBIOTICHE	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	R ²	
AMOXICILLINA + AC.CLAVULANICO	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	3,1	4,6	2,2	1,7	7,1	0,0	2,8	0,0	0,0	3,0	N.S.	
AMPICILLINA	12,4	22,6	14,4	14,3	13,3	12,1	26,9	23,9	18,3	16,1	3,9	15,0	17,9	11,4	15,3	N.S.	
CEFALOSPORINE 1° GEN. (CEFALEXINA)	8,3	8,2	3,3	1,2	3,1	4,5	3,0	2,2	1,7	9,7	0,0	2,6	7,9	0,0	6,6	N.S.	
CEFALOSPORINE 3° GEN. (CEFTIOFUR)	0,9	1,4	2,2	1,2	1,0	1,5	1,5	2,2	1,7	6,5	1,9	2,5	2,5	0,0	3,1	N.S.	
ENROFLOXACIN	3,4	6,2	4,4	1,2	2,0	4,5	4,5	0,0	10,0	9,7	9,4	7,7	9,8	2,6	5,6	N.S.	
FLORFENICOLO	0,0	0,7	1,1	0,0	0,0	1,5	3,0	0,0	6,7	3,2	1,9	7,5	2,5	0,0	5,6	<0,05	
LINCOMICINA	50,0	43,8	61,1	95,2	94,7	100,0	95,5	88,9	88,3	100,0	96,2	92,5	97,4	97,3	90,6	<0,05	
TETRACICLINA	68,3	61,4	51,1	63,1	71,4	62,1	59,7	56,5	78,3	67,7	64,2	62,5	65,9	34,2	47,9	N.S.	
TRIMETHOPRIM + SULFAMETOSSAZOLO	23,2	31,5	26,7	27,4	18,4	27,3	38,8	21,7	26,7	32,3	18,9	21,1	38,5	21,6	23,9	N.S.	
CAMPIONI ESAMINATI	138	146	90	84	97	66	67	46	60	31	52	39	39	34	69	-	

DISCUSSIONE

La valutazione dei risultati ottenuti mostra come l'Amoxicillina+Acido Clavulanico, la Cefalexina, il Ceftiofur, il Florfenicolo e l'Enrofloxacin siano risultate le molecole antibiotiche caratterizzate dall'efficacia maggiore nei confronti di *APP*. Relativamente a questo gruppo è preoccupante il livello di resistenza registrato nel 2016 (35,7%) per Enrofloxacin, antibiotico considerato d'importanza critica tra gli antibiotici utilizzati in ambito suinicolo. Tale dato è in accordo con i risultati ottenuti da altri Autori che riportano l'emergenza di ceppi di *APP* resistenti a Enrofloxacin isolati in Danimarca, in Polonia e UK (Archambault et al., 2012). I livelli di resistenza riscontrati per Enrofloxacin sono mediamente più elevati rispetto a quanto riportato in un precedente lavoro eseguito sempre su ceppi di *APP* isolati da suini con pleuropneumonia in Italia (Vanni et al., 2011). Tale variabilità è probabilmente legata a fattori quali il campionamento e le caratteristiche dei trattamenti antibiotici eseguiti sui singoli animali o nel gruppo dove si è manifestata la patologia e da cui è stato ottenuto l'isolato batterico. In un recente studio è stata dimostrata una variabilità nella risposta agli antibiotici per ceppi di *APP* appartenenti allo stesso biotipo e sierotipo (considerati appartenenti allo stesso clone) e isolati da suini provenienti dallo stesso allevamento. Esisterebbero inoltre fattori legati all'ospite, che in condizioni di stress favorirebbero l'eliminazione e la diffusione di ceppi resistenti, determinando quindi una variabilità nella risposta agli antibiotici nei ceppi isolati (Dayao et al., 2015).

In uno studio condotto in diversi paesi Europei in ceppi di *APP* e *PM* le resistenze a diverse molecole antibiotiche (l'Amoxicillina+Acido Clavulanico, il Ceftiofur, il Florfenicolo, l'Enrofloxacin, la Tiamulina e la Tilmicosina) (Jong et al. 2014) erano assenti o inferiori all'1%. I bassi livelli di resistenza riportati nello studio di de Jong et al. sono da ricondurre anche al tipo di campionamento, eseguito in animali in cui la sospensione della somministrazione di antibiotici era avvenuta almeno 15 giorni prima del campionamento. Un minor livello di attività, considerandoli l'intero periodo dello studio, è stato osservato per Trimethoprim+Sulfametossazolo, Tetracicline e Ampicillina. Questi risultati sono in parte confermati da altri lavori scientifici sull'argomento che descrivono elevati livelli di resistenza nei confronti delle tetracicline sia dei ceppi di *APP* sia di *PM*.

Nel terzo gruppo si colloca la Lincomicina, la quale conferma la sua quasi totale inefficacia contro *APP*, con percentuali di resistenza frequentemente del 100%. Osservando l'efficacia dei diversi antibiotici nei confronti dei ceppi di *APP*, si rileva frequentemente un andamento altalenante nel tempo con differenze sostanziali tra un anno e l'altro. Questo risulta particolarmente evidente per Amoxicillina+Acido Clavulanico, le Cefalosporine in genere, l'Enrofloxacin e il Trimethoprim+Sulfametossazolo. Questa variabilità non evidenzia tuttavia alcun trend statisticamente significativo né in aumento né in diminuzione delle resistenze nel periodo considerato, eccezion fatta per il Florfenicolo e il Trimethoprim+Sulfametossazolo e può essere dovuto a una variabilità dei ceppi di *APP* isolati nel corso degli anni. L'efficacia del Florfenicolo è, a oggi, molto elevata (tasso di resistenza medio dal 2002 al 2016 del 5,8%) ma è possibile osservare un trend positivo nella frequenza d'isolamento di ceppi a diminuita sensibilità (0% nel 2002, 10,7% nel 2016, con picco del 15,8% nel 2007), inquadrabile come possibile campanello di allarme per gli anni a venire considerando che si tratta di una molecola relativamente recente.

In diminuzione, infine, il trend di resistenza per il Trimethoprim+Sulfametossazolo. Le differenze, infatti, sono statisticamente significative, passando dal 62,5% dei casi resistenti del 2002 al 32,1% del 2016. I risultati ottenuti sono in contrasto con gli studi condotti da altri Autori (Vanni et al., 2012) che riportano un trend significativo di aumento delle resistenze per Amoxicillina+Acido Clavulanico, Ampicillina e Trimethoprim+Sulfametossazolo e nessun trend nei confronti del Florfenicolo. Questo potrebbe essere dovuto a una fisiologica variabilità dei ceppi batterici circolanti nel suino, a variazioni nella frequenza e nella tipologia

dei trattamenti antibiotici e a ragioni legate alle modalità di campionamento.

Per quanto riguarda *PM* numerose molecole, tra cui l'Amoxicillina+Acido Clavulanico, la Cefalexina, il Ceftiofur, l'Enrofloxacin, il Florfenicolo, l'Ampicillina e il Trimetropin+Sulfametossazolo, hanno mostrato un buon livello di efficacia nel periodo considerato. Nel secondo gruppo si collocano le Tetracicline, mostrando medio-bassa attività antimicrobica. Nel terzo gruppo la Lincomicina.

Non si riportano variazioni statisticamente significative nel numero d'isolati a diminuita sensibilità nel periodo considerato né in aumento né in diminuzione, ad eccezione del Florfenicolo e della Lincomicina. Come precedentemente riportato nel caso di *APP*, anche per *PM* il Florfenicolo ha evidenziato un trend di aumento della resistenza (0% nel 2002, 5,6% nel 2016, con picco del 7,5% nel 2013), pur mantenendo la sua elevata attività antibiotica (tasso di resistenza medio dal 2002 al 2016 del 2,25%). Interessante, infine, il trend di aumento della resistenza nei confronti della Lincomicina. Nel dettaglio, dal 2002 al 2004 il trend risulta stazionario e compreso tra il 50% e il 61,1% d'isolati resistenti, tra il 2004 e il 2005 si osserva in maniera evidente l'aumento della resistenza, passando dal 61,1% al 95,4%, per poi mantenersi, dal 2005 al 2016, stazionario tra l'88,9% e il 100%. E' possibile che l'utilizzo della Lincomicina somministrata per via orale a scopo terapeutico, profilattico/metafilattico (soprattutto per il controllo e la terapia di patologie gastro-intestinali) abbia giocato un ruolo determinante sull'aumento delle resistenze sia nei ceppi di *APP* sia di *PM*.

In conclusione, una corretta diagnosi e il successivo campionamento unitamente a metodiche standardizzate di laboratorio sono basilari per un corretto e razionale approccio alla scelta dell'antibiotico e al suo utilizzo. Il monitoraggio della sensibilità agli antibiotici, oltre ad essere fondamentale nell'indirizzare la terapia, riveste un'importanza primaria nel permettere di valutare l'insorgenza di fenomeni di resistenza antibiotica nei ceppi batterici patogeni isolati dal suino.

BIBLIOGRAFIA

1. Archambault M, Harel J, Gouré J, Tremblay YD, Jacques M. . (2012). Antimicrobial susceptibilities and resistance genes of Canadian isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2012 Apr;18(2):198-206.
2. Blackall J, Klaasen H, van den Bosch H, Kuhnert P, Frey J.. (2002). Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15 *Vet Microbiol* 84:47–52.
3. Carter GR. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. *Am J Vet Res* 16:481–484.
4. 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
5. Dayao DA, Dawson S, Kienzle MJ, Gibson JS, Blackall PJ, Turni C. (2015). Variation in the Antimicrobial Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Isolates in a Pig, Within a Batch of Pigs, and Among Batches of Pigs from One Farm. *Microb Drug Resist.* 2015 Aug;21(4):491-6
6. de Jong A, Thomas V, Simjee S, Moyaert H, El Garch F, Maher K, Morrissey I, Butty P, Klein U, Marion H, Rigaut D, Vallé M. (2014). Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory tract pathogens isolated from diseased cattle and pigs across Europe: the VetPath study. *Vet Microbiol.* 2014 Aug 6;172(1-2):202-15
7. de Jong MF, Nielsen JP. (1990). Definition of progressive atrophic rhinitis. *Vet Rec* 126:93.
8. Dominick MA, Rimler RB. (1988). Turbinate osteoporosis in pigs following intranasal inoculation of purified *Pasteurella* toxin: histomorphometric and ultrastructural studies. *Vet Pathol* 25:17–27.

9. Donnio PY, Allardet-Servent A, Perrin M, Escande F, Avril JL. (1999). Characterisation of dermonecrotic toxin-producing strains of *Pasteurella multocida* subsp. *Multocida* isolated from man and swine. *J Med Microbiol* 48:125–131
10. Elling F, Pedersen KB, Høgh P, Foged NT. (1988). Characterization of the dermal lesions induced by a purified protein from toxigenic *Pasteurella multocida*. *APMIS*. 1988 Jan;96(1):50-5.
11. European Commission. (2011). Communication from the Commission to European Parliament and the Council: Action Plan against the Risks Threats from Antimicrobial Resistance (COM\2011\748)
12. Frey J, Kuhn R, Nicolet J. (1994). Association of the CAMP phenomenon in *Actinobacillus pleuropneumoniae* with the RTX toxins ApxI, ApxII and ApxIII. *FEMS Microbiol Lett* 124:245–251
13. Jansen R, Briare J, Kamp E, Gielkens AL, Smits MA. (1995). The CAMP effect of *Actinobacillus pleuropneumoniae* is caused by Apx toxins. *FEMS Microbiol Lett* 126:139–143.
14. Kamp E, Popma J, Van Leengoed L. (1987). Serotyping of *Haemophilus pleuropneumoniae* in the Netherlands: with emphasis on heterogeneity within serotype 1 and (proposed) serotype 9. *Vet Microbiol* 13:249–257
15. Laanen M, Persoons D, Ribbens S, de Jong E, Callens B, Strubbe M, Maes D, Dewulf J. (2013). Relationship between biosecurity and production/antimicrobial treatment characteristics in pig herds. *The Veterinary Journal* 198, 508-512
16. Marois C, Fablet C, Gaillot O, Morvan H, Madec F, Kobisch M. (2009). Molecular diversity of porcine and human isolates of *Pasteurella multocida*. *J Appl Microbiol* 107:1830–1836
17. Martineau-Doizé B, Frantz JC, Martineau GP. (1990). Effects of purified *Pasteurella multocida* dermonecrotic toxin on cartilage and bone of the nasal ventral conchae of the piglet. *AnatRec* 228:237–246.
18. Mary D Barton. (2014). Current opinion in microbiology 19: 9-15
19. NCCLS (2003). Performances Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – English edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-5638-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA
20. NCCLS (2004). Performances Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-5638-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA
21. Nielsen R, Andresen L, Plambeck T, Nielsen JP, Krarup LT, Jorsal SE. (1997). Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds. *Vet Microbiol* 54:35–46
22. Nielsen R, O'Connor PJ. (1984). Serological characterization of 8 *Haemophilus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 8. *Acta Vet Scand* 25:96–106.
23. Nielsen R. (1985a). Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype 9. *Acta Vet Scand* 26:501–512.
24. Nielsen R. (1985b). Serological characterization of *Haemophilus pleuropneumoniae* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) strains and proposal of a new serotype: serotype 10. *Acta Vet Scand* 26:581–585.
25. Nielsen R. (1986). Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains and proposal of a new serotype: serotype 12. *Acta Vet Scand* 27:453–455
26. Postma M, Backhans A, Collineau L, Loesken S, Sjolund M, Belloc C, Emanuelson U, Grosse Beilage E, Stark K.D.C., Dewulf J. (2016). The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal* 10:3, 478-489
27. Postma M, Vanderhaeghen W, Sarrazin S, Maes D, Dewulf J. 2016. Reducing Antimicrobial Usage in Pig Production without Jeopardizing Production Parameters. *Zoonoses and Public Health*
28. Rimler RB, Rhoades KR. (1987). Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida*. *J Clin Microbiol* 25:615–618.
29. Rojo-Gimeno C, Postma M, Dewulf J, Hogeveen H, Lauwers L, Wauters E. (2016). Farm-economic analysis of reducing antimicrobial use whilst adopting improved management strategies on farrow-to-finish pig farms. *Preventive Veterinary Medicine*, 129: 74-87
30. Rosendal S, Boyd DA. (1982). *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping. *J Clin Microbiol* 16:840–843.
31. CASFM 2010: Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Communiqué. Available at http://www.sfm-microbiologie.org/pages/?page=746&id_page=182 (accessed September 5, 2012)
32. Van Boeckel T.P., Brower C, Gilbert M, Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., Teillant A, Laxminarayan R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 5649-5654
33. Vanni M, Merenda M, Barigazzi G, Garbarino C, Luppi A, Tognetti R, Intorre L. (2012). Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine. *Vet Microbiol*. 2012 Apr 23;156(1-2):172-7
34. World Health Organization, Geneva. (2014). Antimicrobial resistance: Global report on surveillance

IMPIEGO DEI SOTTOPRODOTTI DELLA MACELLAZIONE DEI SUINI NELLA RICERCA BIOMEDICA

USE OF THE PIG SLAUGHTERING IN BIOMEDICAL RESEARCH

PERRONE V. ¹, GONZALEZ O. ², DI MARCO A. ², CITO G. ¹

¹ *Dipartimento di Prevenzione, Az. USL Roma 2;*

² *Laboratorio in vitro Pharmacology, IRBM SP, Pomezia*

Parole chiave: suino domestico, modello animale, barriera emato-encefalica

Key words: *domestic pig, animal model, blood-brain barrier*

Riassunto

Il suino domestico per la sua elevata biocompatibilità è sempre più considerato un valido modello per sostituire tessuti e organi dell'uomo e questa può essere altrettanto utile in numerosi ambiti di ricerca. Si riporta un'esperienza di utilizzo di cervelli di suino prelevati al macello per la coltura di cellule primarie per simulare la barriera emato-encefalica.

Abstract

The domestic pig for its high biocompatibility is increasingly seen as a valuable model to replace human tissues and organs and this can be just as useful in many areas of research. It is reported experience of the use of pig brains taken at the slaughterhouse for the cultivation of primary cells to mimic the blood-brain barrier.

INTRODUZIONE

I modelli animali rappresentano ancora un indispensabile strumento per la comprensione della patogenesi di malattie dell'uomo. In particolare il modello rappresentato dai roditori utilizzati in laboratorio, pur avendo permesso di acquisire molte informazioni in campo biologico, non è in grado di rappresentare con altrettanta attendibilità nelle ricerche che riguardano lo studio di sindromi o malattie umane (6). Da diverso tempo il suino domestico è sempre più impiegato come modello comparativo per lo studio di patologie umane viste le sue numerose affinità biologiche e fisiologiche con l'uomo. Tra questi possono essere individuati sia fattori estrinseci (è onnivoro come l'uomo, forte analogia con l'apparato cardiovascolare umano, le linee genetiche sono note e si possono evidenziare le correlazioni ereditarie) sia intrinseci (sviluppo dell'aterosclerosi spontanea, analogia delle patologie cardiache e renali con quelle dell'uomo) (1). Il modello suino trova un ulteriore e più recente impiego anche nella ricerca di nuovi farmaci e nello studio della loro efficacia e tossicità (6). Si descriverà di seguito un esempio di utilizzo di cervelli di suini domestici prelevati al macello per riprodurre *in vitro* la barriera emato-encefalica (BEE) per lo studio del suo ruolo nei meccanismi di *drug-delivery* nel sistema nervoso centrale (SNC) e lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche per migliorare la qualità di vita di pazienti affetti da patologie del SNC.

Materiali e metodi

La BEE è un'unità anatomico-funzionale costituita dalle particolari caratteristiche delle cellule endoteliali che compongono i vasi del SNC ed ha principalmente la funzione di protezione del tessuto cerebrale dagli elementi nocivi presenti nel sangue permettendo tuttavia il passaggio di sostanze necessarie alle funzioni metaboliche. Quindi la presenza

della BEE può impedire alle terapie neuroriparatrici e neuroprotettive di arrivare a svolgere la loro azione farmacologica direttamente *in loco* rappresentando così un'importante sfida per il settore terapeutico. Nonostante che proprio la neurofarmaceutica rappresenti il più grande settore di crescita dell'industria del farmaco il suo progresso è rallentato dalla difficoltà di risolvere in modo efficace il problema dell'attraversamento della BEE (4).

Scelta del modello cellulare

Molte sono le linee cellulari continue derivanti da cellule umane e varie specie animali per la maggior parte di origine tumorali ma che inevitabilmente hanno perso gran parte delle caratteristiche fenotipiche rispetto alle cellule sane di origine. La loro capacità di crescita è virtualmente illimitata e possono essere utilizzate in condizioni di laboratorio per molti anni ma in tal caso si dovrà tenere conto ad ogni passaggio dell'accumulo di errori genomici e pertanto non va dimenticato che la risposta di queste cellule in determinati contesti è diversa dalla risposta che una cellula *in vivo* può dare allo stesso stimolo. Mentre la coltura di cellule primarie, pur mantenendo i limiti dell'artificialità della coltura *in vitro*, è probabilmente un modello migliore per predire una risposta più vicina a quella *in vivo* e sempre più vengono scelte dai laboratori per le loro ricerche. Le colture primarie sono prodotte coltivando cellule prelevate da organi espunti da animali o da biopsie da donatori umani e mantenute in coltura per un periodo di poche settimane limitando così l'accumulo di aberrazioni. Tra i sistemi studiati di colture primarie provenienti da diverse specie animali le cellule cerebrali endoteliali provenienti da suini domestici mostrano le caratteristiche di BEE più vicine a quelle *in vivo*. Da non trascurare anche il fatto che, date le sue dimensioni, dal cervello di suino si ottiene una maggiore resa cellulare rispetto ai roditori da molti utilizzati.

Modalità di prelievo e trasporto

Il cervello viene prelevato dai suini il più rapidamente possibile appena effettuata la visita *post mortem*, immediatamente deposto in appositi contenitori sterili, immerso in un adeguato terreno di conservazione e quindi trasportati in contenitori autorizzati ai sensi del Reg. CE n. 1069/2009 accompagnati da un certificato sanitario rilasciato dall'autorità competente per i sottoprodotti di origine animale (SOA) da impiegare in ambito di ricerca.

Preparazione di cellule endoteliali da cervello di suino

Una volta giunti in laboratorio i cervelli vengono processati secondo il seguente protocollo sperimentale (5): dopo il lavaggio degli organi con soluzione salina si provvede alla rimozione delle meningi e della materia bianca. La materia grigia così isolata è posta in terreno idoneo e sterile per essere omogeneizzata e ulteriormente processata utilizzando cappe biologiche di classe II a flusso laminare verticale. I frammenti dei microvasi ottenuti vengono portati lentamente a -80 °C e infine conservati in azoto liquido. Le aliquote saranno in seguito scongelate e piastrate per ottenere cellule primarie endoteliali da utilizzare come sistema *in vitro* per studiare il trasporto di potenziali agenti terapeutici.

CONCLUSIONI

La ricerca biomedica può ridurre ma non certo eliminare l'impiego di modelli animali per le sue attività e tra queste primaria importanza rivestono quelle nell'ambito della neurofarmaceutica per la messa a punto di validi presidi contro le patologie del SNC dell'uomo. Di recente l'uso del suino domestico come modello animale trova sempre più spazio grazie alle sue caratteristiche di forte biocompatibilità con l'uomo e questo avviene in larga misura nella ricerca sugli xenotrapianti per ovviare alla cronica carenza di organi umani da trapiantare (3). Ma anche i suini da macello possono vedere un loro impiego

ulteriore a quello alimentare potendo fornire SOA da destinare ad attività di ricerca biomedica comportando, oltre a quello storico di presidi sanitari della prevenzione primaria, un rinnovato ruolo anche per gli impianti di macellazione. Per ultimo va sottolineato il valore etico dell'impiego di animali comunque destinati al sacrificio della macellazione che può rientrare appieno nell'approccio più moderno ed etico in sperimentazione animale conosciuto come "principio delle 3R": *replacement* (rimpiazzare), *reduction* (ridurre), *refinement* (rifornire) (2).

BIBLIOGRAFIA

1. Guarda F., Tursi M. (2002) "Il suino come modello animale per l'uomo: mito o realtà?". Large Animal Review, n. 2, 65-68
2. Fossati P. (2010) "Il diritto degli animali da esperimento" Torino, C.G. Edizioni Medico Scientifiche
3. Lo Monte A. I., Fiasconaro M., Di Marco V., Cuccia V., Caracappa S. (2000) "Il suino come potenziale donatore multiorgano per i trapianti sull'uomo. Rischi e prospettive" Large Animal Review, n. 1, 39-42
4. Pardridge W. M. (2001) "Brain drug targeting and gene technologies" Jpn. J. Pharmacol. Oct 87, 97-103
5. Patabendige A., Skinner R., Morgan L., Joan Abbott, N. (2013) "A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells" Brain Res. 1521, 16-30.
6. Walters . M., Agca Y., Ganjam V., Evans T. (2011) "Animal models got you puzzled?: think pig" Ann. N. Y. Acad. Sci. 1245, 63-64

**APPLICAZIONE DI PROTOCOLLI VACCINALI PER IL
CONTROLLO DI *SALMONELLA* TYPHIMURIUM VARIANTE
MONOFASICA NELL'ALLEVAMENTO SUINO**

***APPLICATION OF DIFFERENT VACCINATION PROTOCOLS TO
CONTROL *SALMONELLA* TYPHIMURIUM MONOPHASIC VARIANT
IN PIGS***

RUGGERI J.¹, CHIRULLO B.², DRUMO R.², PESCIAROLI M.³, MARTINELLI N.¹,
SCAGLIONE F.E.⁴, PREGEL P.⁴, AMMENDOLA S.⁵, LAZZARO M.¹, GIACOMINI
E.¹, OSSIPRANDI MC.⁶, CORRADI A.⁶, BATTISTONI A.⁵, BOLLO E.⁴, PASQUALI P.²,
ALBORALI G.L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 25124
Brescia, Italy;*

²*Department of Veterinary Public Health and Food Safety, Istituto Superiore di Sanità, 00161
Rome, Italy; FAO Reference Center for Veterinary Public Health.*

³*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia, Italy;*

⁴*Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Torino, 10095 Torino, Italy;*

⁵*Department of Biology, Università di Roma Tor Vergata, 00133 Rome, Italy;*

⁶*Department of Veterinary Sciences, Università degli Studi di Parma, 43100 Parma, Italy;*

Parole chiave: *Salmonella* Typhimurium variante Monofasica, Controllo, Sanità Pubblica.
Keywords: *Salmonella* Typhimurium Monophasic Variant, Control, Public Health.

Riassunto

L'infezione umana sostenuta da mST è sempre più frequente negli ultimi anni ed il consumo di carne di suino contaminata rappresenta una delle principali fonti di trasmissione. Nell'allevamento suino l'infezione è controllata attraverso l'uso di antibiotici, tuttavia l'incremento di ceppi multiresistenti ha determinato una riduzione dei principi attivi utili per la terapia nell'uomo e negli animali e per tale motivo risulta necessario applicare nuove strategie di controllo. La vaccinazione rappresenta uno strumento efficace soprattutto se associato ad un'ottima gestione manageriale dell'allevamento. Tuttavia, vaccini efficaci e sicuri non sono attualmente disponibili per la profilassi in Italia. L'obiettivo di questo lavoro è quello di descrivere i risultati ottenuti dalla vaccinazione con un ceppo attenuato di mST testato in condizioni sperimentali ed i risultati ottenuti dalla vaccinazione con un ceppo inattivato e stabulogeno di mST testato in condizioni di campo. Il protocollo vaccinale ideale è caratterizzato dalla vaccinazione delle scrofe, prima del parto, con un vaccino inattivato o stabulogeno garantendo un'adeguata trasmissione di immunoglobuline alle nidiate attraverso il colostro. Successivamente, si completa con la vaccinazione dei suinetti con un vaccino attenuato che meglio attiva l'immunità cellulo-mediata. In questo modo, sia la componente umorale che quella cellulo-mediata sono correttamente stimulate garantendo una protezione completa.

Abstract

Human infection caused by *Salmonella* Typhimurium monophasic variant (mST) is increasingly frequent during last years and contaminated pork meats represent one of the most important source of transmission. Control of infection in piggeries is principally based on administration of antibiotics in feed. Unfortunately, increment of multidrug-resistant strains has underlined the necessity to apply new control strategies. Vaccination, associated

to good farming management, is effective, however, efficacious and safe vaccines are not available. The aim of project is to show results obtained from different research activities focused on application of a mST attenuated vaccine tested in experimental conditions and on application of a mST bacterins administered in animals of an endemic farms. An ideal vaccination protocol is characterized by vaccination of sows with an autogenous vaccine, before delivery, guaranteeing an adequate transmission of immunoglobulin through colostrums and vaccination of piglets with an attenuated vaccine which better activates cell-mediated immune system. In this way, both humoral and cell-mediated immune systems are correctly activated to protect animals.

INTRODUZIONE

Salmonella Typhimurium variante Monofasica è un cocco-bacillo, Gram-, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile, non lattosio fermentante, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Questo ceppo, la cui formula antigenica è 4,[5],12:i:-, ha perso o non esprime la fase 2 dell'antigene flagellare (H2) e per tale motivo si differenzia da *Salmonella* Typhimurium (Echeita et al., 2001; Switt et al., 2009). L'antigene flagellare è responsabile della motilità del batterio e per il genere *Salmonella* esistono 35 antigeni flagellari che esprimono due fasi. L'espressione dell'antigene flagellare sta alla base dell'identificazione dei vari sierotipi di *Salmonella* spp. L'espressione delle fasi dell'antigene flagellare consente di distinguere i ceppi in monofasici o bifasici. La variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium è stata identificata durante gli anni Novanta e la sua incidenza è nettamente incrementata nel corso degli ultimi due decenni come conseguenza della rapida diffusione del patogeno e dell'affinamento delle metodiche diagnostiche (Echeita et al., 1999). *S.*Typhimurium variante monofasica è largamente diffusa nell'ambiente e nel suino determina una sintomatologia enterica scarsamente distinguibile da quella indotta da *S.*Typhimurium. Tuttavia, a differenza di *S.*Typhimurium, negli animali la sintomatologia sembrerebbe essere leggermente attenuata e, per tale motivo, numerosi animali portatori asintomatici albergano il patogeno e determinano la contaminazione delle carcasse in fase di macellazione. Il consumo di prodotti di carnei poco cotti determina un incremento del rischio di trasmissione all'uomo, il quale manifesta una sintomatologia più severa rispetto che l'animale (Hauser et al., 2010; Arnold et al., 2015). Inoltre, l'utilizzo non controllato di antibiotici ad uso metafilattico negli animali ha determinato un incremento di ceppi multiresistenti di *S.*Typhimurium e *S.* Typhimurium variante Monofasica e, conseguentemente, una drastica riduzione dei principi attivi disponibili per la terapia nell'uomo. Per tale motivo, a tutela della Salute Pubblica, risulta necessario intraprendere nuove strategie per il controllo dell'infezione negli animali e ridurre la percentuale di malattia nell'uomo associata al consumo di prodotti contaminati. I sierotipi maggiormente coinvolti nella salmonellosi dell'uomo sono *S.*Enteritidis (principalmente trasmessa con il consumo di prodotti avicoli) e *S.* Typhimurium, inclusa la variante monofasica (principalmente trasmessa con il consumo di carne di suino). La Comunità Europea ha emanato diversi Regolamenti (E.R. n° 2160/2003 e successive implementazioni) con l'obiettivo di tutelare la salute dei consumatori e di ridurre la percentuale di salmonellosi nell'uomo associata al consumo di prodotti di origine animale. Principalmente, è stato richiesto agli Stati Membri il controllo delle infezioni da *Salmonella* sp. nelle specie avicole e l'applicazione obbligatoria della vaccinazione in questi animali ha determinato una drastica riduzione dei casi di salmonellosi nell'uomo. Alla luce degli ottimi risultati ottenuti con l'applicazione della vaccinazione negli allevamenti avicoli e con l'obiettivo di ridurre l'uso di antibiotici negli allevamenti suini, la Comunità Europea potrebbe richiedere l'applicazione di nuove misure di controllo, compresa la vaccinazione, nei confronti dei sierotipi principalmente isolati nella filiera suina. A differenza dell'allevamento avicolo, non esistono in Italia vaccini

registrati per il controllo di *S.* Typhimurium variante monofasica nei suini. L'obiettivo di questo lavoro è di presentare i risultati ottenuti dall'applicazione di un vaccino attenuato e di uno inattivato per il controllo delle infezioni da *S.* Typhimurium variante monofasica nell'allevamento suino.

MATERIALI E METODI

Applicazione di un protocollo vaccinale con ceppo attenuato in condizioni sperimentali

*S.*Typhimurium (ST) e *S.*Typhimurium variante Monofasica (mST) sono i sierotipi più frequentemente isolati nell'allevamento suino. L'obiettivo dell'applicazione di questo protocollo vaccinale è stato la verifica della sicurezza e dell'efficacia di un vaccino attenuato di *S.* Typhimurium variante Monofasica (mSTΔznuABC) in corso d'infezione omologa (mST) ed eterologa (ST). Il vaccino attenuato è stato prodotto inserendo una cassetta di resistenza alla streptomicina e cloramfenicolo nei geni che codificano per il trasporto dello zn (znuABC) secondo il protocollo pubblicato in precedenza (Ammendola et al., 2007). Il disegno sperimentale ha previsto la divisione in 4 gruppi di 20 suinetti svezzati provenienti da allevamenti *Salmonella*-free. Il gruppo A (5 suini) ed il gruppo B (5 suini) sono stati vaccinati con 5×10^7 UFC di mSTΔznuABC per via orale ed l'eliminazione fecale del ceppo vaccinale è stata monitorata tramite esame microbiologico a cadenza settimanale fino al giorno 35 post-vaccinazione. L'infezione è avvenuta il giorno 36 post vaccinazione con 5×10^8 UFC di mST nei gruppi A e D e 5×10^8 UFC di ST nei gruppi B e C. I parametri valutati sono stati il peso, la temperatura, l'eliminazione fecale del ceppo vaccinale e del ceppo virulento e la colonizzazione degli organi (tonsille, linfonodi ileociecocolici, milza, ileo, cieco e colon).

Applicazione di un protocollo vaccinale con ceppo inattivato in condizioni di campo

L'obiettivo di questo studio è stato la valutazione dell'efficacia di un vaccino stabulogeno di *S.* Typhimurium variante monofasica testato in condizioni di campo tramite l'applicazione di diversi protocolli. Tali protocolli hanno previsto la sola vaccinazione dei riproduttori, la sola vaccinazione degli animali in fase di accrescimento e la vaccinazione combinata dei riproduttori e delle loro niate. L'ipotesi iniziale è stata che la vaccinazione dei riproduttori determina una produzione di anticorpi trasmessi alla prole tramite il colostro e la presenza di immunoglobuline mucosali inibisce l'attecchimento e l'invasione del patogeno che penetra per via orale. I gruppi oggetto di studio sono stati i seguenti: 20 scrofe vaccinate (gruppo V), 20 scrofe non vaccinate (gruppo nV), 30 suinetti vaccinati e figli di scrofe vaccinate (VV), 30 suinetti non vaccinati e figli di scrofe vaccinate (VnV), 30 suinetti vaccinati e figli di scrofe non vaccinate (nVV) e 30 suinetti non vaccinati e figli di scrofe non vaccinate (nVnV). Il vaccino è stato prodotto da un ceppo isolato da un'azienda endemica oggetto dello studio. Il ceppo è stato isolato, amplificato, inattivato e somministrato ai riproduttori (gruppo V), alla sesta e alla seconda settimana antecedente il parto, e ai suinetti (gruppi VV e nVV) alla quarta e all'ottava settimana di vita alla dose 2×10^9 UFC per via intramuscolare. Gli animali oggetto dello studio sono stati identificati con delle apposite marche auricolari e allevati nelle medesime condizioni degli animali non oggetto dello studio per verificare l'efficacia della vaccinazione in una situazione più rappresentativa delle condizioni di campo. I campioni prelevati nei riproduttori sono stati il sangue, le feci e i tamponi ambientali a 7 giorni dal parto, al momento del parto e tre settimane dopo. I suinetti sono stati monitorati dalla nascita alla macellazione. Il peso è stato registrato a 2, 28, 125 e 293 giorni di vita, il sangue è stato prelevato a 2, 28, 91, 125, 250 e 293 giorni di vita, le feci sono state prelevate a 2, 28, 125 e 293 giorni di vita, i tamponi ambientali sono stati prelevati a 7 giorni dallo spostamento nei box della fase di svezzamento ed infine, le tonsille, i linfonodi ileociecocolici e il contenuto intestinale sono stati prelevati in fase di macellazione (giorno 294 di vita). Gli esami eseguiti

sono stati l'esame microbiologico semiquantitativo per le feci e gli organi e l'esame sierologico per la valutazione del titolo anticorpale del sangue.

RISULTATI

Efficacia di S. Typhimurium variante monofasica ΔznuABC a seguito del challenge omologo ed eterologo

I risultati registrati nella prima prova sperimentale hanno confermato che il vaccino attenuato pur essendo un ceppo vivo non ha determinato alterazioni nel ritmo di crescita degli animali ed il trend d'eliminazione fecale del ceppo vaccinale ha corroborato dati precedentemente pubblicati (Pesciaroli et al, 2013; Ruggeri et al., 2014) per cui il ceppo non è più rilevabile dopo la terza settimana dalla vaccinazione. In merito all'efficacia della vaccinazione, è emerso che l'eliminazione fecale sia di mST sia di ST ha subito una drastica riduzione nei primi sette giorni successivi all'infezione nei gruppi vaccinati. La differenza è risultata statisticamente significativa al giorno 14 post-infezione tra i gruppi vaccinati ed il corrispondente gruppo non vaccinato, ma infetto con mST o con ST. Tuttavia, la differenza non ha raggiunto la significatività statistica durante i successivi time-points. In merito alla colonizzazione organica, è emerso che la vaccinazione con mSTΔznuABC ha determinato una riduzione della colonizzazione delle tonsille e dei linfonodi da parte del ceppo eterologo virulento (ST) rispetto alla colonizzazione dei medesimi organi del gruppo non vaccinato ed infetto con il medesimo ceppo eterologo virulento. Nessuna differenza di colonizzazione organica nella milza, nell'ileo, nel cieco e nel colon è stata registrata tra i gruppi vaccinati e non vaccinati entrambi infetti con mST o ST. Tuttavia, anche se la differenza non raggiunge la significatività statistica, la vaccinazione sembrerebbe ridurre la colonizzazione dell'ileo e del colon in animali vaccinati ed infetti con mST o con ST.

Efficacia del vaccino stabulogeno di S. Typhimurium variante monofasica testato in riproduttori e suinetti

I risultati ottenuti dall'applicazione in campo di un vaccino stabulogeno inattivato hanno evidenziato che la vaccinazione delle madri migliora il peso dei suinetti allo svezzamento ed, inoltre, è stata registrata una differenza statisticamente significativa di peso medio tra suini vaccinati figli di scrofe vaccinate (VV) e suini non vaccinati figli di scrofe non vaccinate (nVnV) sia in fase di ingrasso che di macellazione. La vaccinazione delle scrofe non determina alcuna riduzione della loro eliminazione fecale, tuttavia determina una riduzione del numero di suinetti eliminatori in fase di svezzamento. Ugualmente la vaccinazione delle scrofe e dei suinetti determina una riduzione del numero dei soggetti eliminatori in fase di ingrasso, ma nessuna differenza è stata evidenziata tra i gruppi nVV e VnV, che hanno subito un unico intervento vaccinale. Il titolo anticorpale delle scrofe vaccinate tende a decrescere tra l'ultima fase della gravidanza fino allo svezzamento delle nidiate, diversamente il titolo anticorpale cresce nel medesimo periodo nelle scrofe non vaccinate indicando una possibile circolazione del patogeno. Il titolo anticorpale dei suinetti prima della loro vaccinazione è maggiore nei figli delle scrofe vaccinate rispetto che ai figli delle scrofe non vaccinate. Il titolo anticorpale dei suini dopo la loro vaccinazione evidenzia che il gruppo VnV ha un titolo anticorpale statisticamente inferiore rispetto agli altri gruppi per tutto il periodo di studio. Il gruppo VV ha un titolo anticorpale maggiore rispetto al gruppo VnV a causa del richiamo vaccinale eseguito nei suinetti all'ottava settimana di vita. Tuttavia, in questi gruppi che sono entrambi costituiti dai figli di scrofe vaccinate (VnV e VV) il titolo anticorpale tende a ridursi nel tempo o subire leggere inflazioni. Diversamente, nei gruppi nVnV e nVV costituiti da suini figli di scrofe non vaccinate, il titolo anticorpale è superiore rispetto al gruppo VnV per tutto il periodo di studio ed inoltre aumenta esponenzialmente in fase di magronaggio-ingrasso fino alla macellazione indicando una circolazione del patogeno.

DISCUSSIONE

Sicurezza ed efficacia del vaccino attenuato di S. Typhimurium variante monofasica

L'analisi della sicurezza del ceppo vaccinale attenuato mSTΔznuABC ha evidenziato che la crescita degli animali non è alterata dalla somministrazione per via orale di tale ceppo. Inoltre, i dati relativi all'ecotossicità hanno evidenziato che il ceppo non è più rilevabile dopo tre settimane nelle feci degli animali, corroborando i dati già pubblicati relativi all'ecotossicità di un ceppo attenuato di *S. Typhimurium* (STΔznuABC) (Ruggeri et al., 2014; Pesciaroli et al., 2013; Gradassi et al., 2013). In relazione all'efficacia, è emerso che la vaccinazione riduce significativamente l'eliminazione fecale sia di mST sia di ST al 14° giorno successivo all'infezione. In merito alla colonizzazione organica, il ceppo vaccinale riduce significativamente la colonizzazione del ceppo eterologo virulento ST nelle tonsille e nei linfonodi. La valutazione della virulenza dei ceppi wild type consente di dedurre che ST sembrerebbe più virulento rispetto a mST. A parità di dosaggio d'infezione, gli animali vaccinati o non vaccinati, ma infetti con mST, hanno mostrato un incremento di peso leggermente superiore, un minore rialzo febbrile e un'eliminazione fecale meno cospicua a confronto degli animali infetti con ST. Tuttavia, a livello organico mST ha colonizzato maggiormente le tonsille e i linfonodi rispetto che ST. La mancanza della seconda fase flagellare sembrerebbe non influenzare l'invasione mucosale (Crayford G. et al., 2014) e sembrerebbe ridurre la stimolazione della risposta aspecifica ed infiammatoria che aiutano l'ospite a controllare l'infezione (Van Parys et al., 2011), per tali motivi questo ceppo è avvantaggiato nella colonizzazione organica.

Efficacia del vaccino stabulogeno di S. Typhimurium variante monofasica

I risultati ottenuti dimostrano che il vaccino stabulogeno di *S. Typhimurium* variante monofasica è in grado di ridurre la prevalenza d'infezione, l'eliminazione fecale e la colonizzazione organica in suini allevati in aziende endemiche. Il grado di efficacia è relazionato al protocollo vaccinale applicato (vaccinazione delle scrofe e dei suinetti o sola vaccinazione di scrofe o di suinetti). Il protocollo migliore è risultato la doppia vaccinazione di scrofe e suinetti. Gli animali nati da scrofe vaccinate assumono tramite colostro un ingente quantitativo di anticorpi mucosali che sono più protettivi rispetto che gli anticorpi sierici in corso d'infezione con un patogeno facoltativo intracellulare come *Salmonella* sp. La somministrazione del vaccino inattivato anche nelle nidiate in un periodo caratterizzato dalla riduzione dell'immunità materna e da stress ambientale dovuto allo svezzamento fornisce un valido supporto per il controllo dell'infezione. Il gruppo VV è risultato il più protetto per il migliore incremento di peso, per il minore numero di animali eliminatori e per il minore numero di organi colonizzati, riducendo anche il rischio di introduzione del patogeno in fase di macellazione e di possibile trasmissione all'uomo.

CONCLUSIONE

Salmonella Typhimurium variante monofasica rappresenta sempre più un problema di Sanità Pubblica per l'incremento dei casi umani di salmonellosi dovuti al consumo di carne di suino contaminata con questo sierotipo. Inoltre, rappresenta un problema di sanità animale per le ingenti perdite economiche dovute ad un ritardato accrescimento e al costo dei trattamenti. A seguito dell'introduzione della vaccinazione obbligatoria negli allevamenti avicoli, il suino rappresenta una delle principali fonti responsabili della malattia nell'uomo. Per tale motivo, la Comunità Europea potrebbe richiedere nuovi ed efficaci sistemi di controllo anche nell'allevamento suino e la vaccinazione rappresenta il sistema di controllo più adatto in aree ad elevata presenza di allevamenti endemici. Tuttavia, vaccini sicuri ed efficaci per il controllo dell'infezione da *Salmonella* sp. nell'allevamento suino non sono disponibili in Italia. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di fornire dei risultati preliminari ottenuti dall'applicazione sia di un vaccino attenuato sia di un vaccino inattivato. I vaccini attenuati rappresentano la scelta migliore poiché è stata ampiamente dimostrata la loro capacità a stimolare prevalentemente il

sistema immunitario cellulo-mediato che è più protettivo nei confronti dei patogeni intracellulari facoltativi come *Salmonella* sp. Diversamente, i vaccini inattivati risultano essere più sicuri in quanto prodotti con un ceppo spento. Alla luce dei risultati ottenuti, è emerso che sia il vaccino attenuato che quello inattivato hanno avuto un ruolo importante nel controllo dell'infezione. In conclusione, il protocollo vaccinale ideale dovrebbe basarsi sulla vaccinazione dei riproduttori con un ceppo inattivato, preferibilmente stabulogeno, a fine gestazione. Le immunoglobuline trasferite alla nidiata tramite il colostro, essendo prevalentemente mucosali, giocano un ruolo importante nel controllo dell'attecchimento e dell'invasione del patogeno. Successivamente, gli animali in fase di svezzamento dovrebbero essere vaccinati con un ceppo attenuato che stimola prevalentemente una risposta immunitaria cellulo-mediata più protettiva nei confronti di patogeni facoltativi intracellulari come *Salmonella* sp.

BIBLIOGRAFIA

- Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A (2007). "High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*". *Infect Immun.* 75(12):5867-76.
- Arnold ME, Gosling RJ, Martelli F, Mueller-Doblies D, Davies RH (2015). "Evaluation of the sensitivity of faecal sampling for detection of monophasic *Salmonella Typhimurium* and other *Salmonella* in cattle and pigs". *Epidemiol Infect.* 143(8):1681-91.
- Crayford G, Coombes JL, Humphrey TJ, Wigley P (2014). "Monophasic expression of *FliC* by *Salmonella* 4,[5],12:i:- DT193 does not alter its pathogenicity during infection of porcine intestinal epithelial cells". *Microbiology.* 160(Pt 11):2507-16.
- Echeita MA, Aladueña A, Cruchaga S, Usera MA (1999). "Emergence and spread of an atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain in Spain". *J Clin Microbiol.* 37(10):3425.
- Echeita MA, Herrera S, Usera MA (2001). "Atypical, *fljB*-negative *Salmonella enterica* subsp. *enterica* strain of serovar 4,5,12:i:- appears to be a monophasic variant of serovar *Typhimurium*". *J Clin Microbiol.* 39(8):2981-
- Gradassi M., Pesciaroli M., Martinelli N., Ruggeri J., Petrucci P., Hassan W.H., Raffatellu M., Scaglione F.E., Ammendola S., Battistoni A., Alborali G.L., Pasquali P. (2013) "Attenuated *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* lacking the *ZnuABC* transporter: an efficacious orally-administered mucosal vaccine against salmonellosis in pigs". *Vaccine.* 31, 3695-701.
- Hauser E, Tietze E, Helmuth R, Junker E, Blank K, Prager R, Rabsch W, Appel B, Fruth A, Malorny B(2010). "Pork contaminated with *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:-, an emerging health risk for humans". *Appl Environ Microbiol.*;76(14):4601-10.
- Pesciaroli M., Gradassi M., Martinelli N., Ruggeri J., Pistoia C., Raffatellu M., Magistrali C.F., Battistoni A., Pasquali P., Alborali G.L. (2013). "Salmonella *Typhimurium* lacking the *Znuabc* transporter is attenuated and immunogenic in pigs". *Vaccine.* 31, 2868-73.
- Ruggeri J., Pesciaroli M., Gaetarelli B., Scaglione F.E., Pregel P., Ammendola S., Battistoni A., Bollo E., Alborali G.L., Pasquali P. (2014) "Parenteral administration of attenuated *Salmonella Typhimurium* Δ*znuABC* is protective against salmonellosis in piglets." *Vaccine* 7;32(32):4032-8
- Switt AIM, Soyer Y, Warnick LD, Wiedmann M (2009). "Emergence, distribution, and molecular and phenotypic characteristics of *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-". *Foodborne Pathog Dis.* 6(4):407-15.
- Van Parys A, Boyen F, Leyman B, Verbrugghe E, Haesebrouck F, Pasmans F (2011). "Tissue-specific *Salmonella Typhimurium* gene expression during persistence in pigs". *PLoS One.*;6(8):e24120.

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI PROSTAGLANDINE NEL POST-PARTUM: RISULTATI PRELIMINARI SUI SEGNI CLINICI DELLA SCROFA

EFFECT OF PROSTAGLANDINS ADMINISTERED POST-PARTUM TO THE SOW: PRELIMINARY RESULTS ON CLINICAL PARAMETERS

SCOLLO A.¹, TROGU E.¹, CASAPPA, P.², MAZZONI C.¹

¹ Medico Veterinario, Suivet snc; ² Ceva Salute Animale

Parole chiave: Scrofa, prostaglandine, segni clinici, post-partum

Key words: Sow, prostaglandins, clinical parameters, post-partum

Riassunto

Le prostaglandine vengono largamente utilizzate per l'induzione al parto della scrofa e per la gestione del suo post-partum con effetti positivi sulla lattazione e sul parto successivo. Il presente studio preliminare illustra gli effetti clinici della somministrazione di prostaglandine nel post-partum in diverse categorie di scrofe, identificando quelle che beneficiano maggiormente del trattamento. Sono state monitorate durante il loro post-partum 75 scrofe: gruppo controllo (n = 37 scrofe, nessun trattamento farmacologico post-partum), e gruppo trattato con dinoprost (n = 38; 36 ore post-partum). Dopo tre giorni dal parto, tutte le scrofe sono state clinicamente visitate per temperatura rettale, frequenza respiratoria, ingestione alimentare, scoli vaginali, infiammazione della mammella, ed eiezione di latte. Per l'analisi dei risultati sono stati creati dei sottogruppi di scrofe in base a durata del parto, esplorazioni uterine, numero di nati morti, e trattamenti farmacologici aggiuntivi. La frequenza respiratoria è aumentata nel gruppo trattato con dinoprost, essendo un blando effetto collaterale già riportato in bibliografia. Tra le sottoclassi di scrofe trattate con dinoprost, quelle che presentavano un parto più lungo (> 3 ore) e alle quali erano stati somministrati trattamenti farmacologici aggiuntivi al parto sembrano ridurre l'infiammazione della mammella. Inoltre, quelle che avevano richiesto maggiori interventi esplorativi hanno ridotto gli scoli vaginali. Il presente studio suggerisce che il trattamento con dinoprost sia in grado di migliorare alcuni parametri clinici in classi di scrofe problematiche.

Abstract

Prostaglandins are widely used for farrowing induction in sows and for the management of post-partum with positive effects on lactation and on the next farrowing. The present preliminary study illustrates clinical effects of postpartum prostaglandin administration in different sows, identifying those benefiting more from the treatment. Seventy-five sows were monitored during the post-partum: control group (n = 37 sows, no postpartum drug treatment), and treated group by dinoprost (n = 38; 36 hours postpartum). Three days after farrowing, all sows were clinically visited recording rectal temperature, respiratory rate, feed ingestion, vaginal discharge, inflammation of the breast, and ejection of milk. For the analysis of results, subgroups of sows were created by farrowing length, uterine explorations, presence of stillbirths, and additional pharmacological treatments. The respiratory rate increased in sows treated with dinoprost, being a mild side effect already reported in the literature. Among the subclasses of sows treated with dinoprost, those that presented a slow farrowing (> 3 hours) and those that were received additional pharmacological treatments during farrowing seem to reduce inflammation of the breast. Sows which required more uterine exploration reduced the vaginal discharge. The present study suggests that treatment with dinoprost can improve clinical parameters in problematic sows classes.

INTRODUZIONE

I benefici e l'efficacia dell'utilizzo di prostaglandine PGF2α nell'induzione al parto della scrofa sono noti da molti anni (Dial, 1984). Tuttavia la loro somministrazione nell'immediato post-partum sembra avere altrettanta efficacia nel far tornare in estro le scrofe più velocemente dopo lo svezzamento, nell'ottenere maggiore prolificità dei parti successivi e nel ridurre e prevenire scoli vaginali, premature eliminazioni delle scrofe, e in qualche caso anche la loro morte. Gil et al. (1990) hanno riportato che, iniettando 10 mg di PGF2α alle scrofe 24-48 ore dopo il parto in una azienda con ricorrenti casi di scoli vaginali e ritardati ritorni in estro, gli animali mostravano una riduzione dei ritorni in calore (13,9% versus 24,2%), la riduzione dell'incidenza degli scoli vaginali (0% versus 2,7%), e un aumento di suinetti nati vivi per scrofa (11,32 versus 10,77). Le conseguenze studio, gli stessi autori (Gil et al., 1990) hanno riportato che il trattamento riduceva anche i problemi riproduttivi come il tasso di riforma delle scrofe (1,14% versus 8,19%) e migliorava la portata al parto successivo (90% versus 74%). Inoltre, l'utilizzo delle prostaglandine nel post-partum può aumentare la produzione del latte nella scrofa e conseguentemente aumentare il peso dei suinetti e diminuirne la mortalità neonatale. Uno studio condotto in Canada (de Passillé et al., 1993) ha evidenziato come i suinetti in lattazione restano più lentamente nei primi tre giorni di vita in caso di alti livelli di progesterone della madre. Per questo motivo, il precoce trattamento post-partum con prostaglandine può migliorare il peso della nidiate anche grazie al suo effetto velocità sante nella rimozione del corpo luteo della gravidanza, responsabile della produzione di progesterone e quindi potenzialmente della conseguente riduzione di produzione di latte.

Mentre in bibliografia sono già presenti diversi lavori che riportano gli effetti della somministrazione di dinoprost sui dati produttivi durante la lattazione e nel parto successivo, il presente studio ha l'obiettivo di verificare gli effetti clinici della somministrazione di prostaglandine in diverse categorie di scrofe, nell'intento di identificare le classi di animali che beneficiano maggiormente del trattamento e alle quali dedicare maggiori attenzioni nel post-partum. Facendo parte di un progetto di ricerca più ampio, i risultati illustrati rappresentano dei dati preliminari al proseguimento della prova.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Lo studio è stato condotto in una scrofaia intensiva nel Nord-Ovest italiano, da Maggio a Luglio. Sono state monitorate durante il loro post-partum 75 scrofe di genetica ibrida, con ordini di parto dal secondo al decimo. Il numero totale di suinetti nati dalle 75 scrofe sono stati 991, anch'essi monitorati durante la lattazione. Le scrofe ed i suinetti erano alloggiati in gabbie parto convenzionali e sono stati gestiti con le classiche procedure di un allevamento intensivo. Gli animali sono stati suddivisi in maniera randomizzata in due gruppi di trattamento: il gruppo controllo (n = 37 scrofe), che non ha ricevuto alcun trattamento farmacologico post-partum; ed il gruppo trattato con dinoprost (n = 38; Enzaprost 10 mg/capo) per via intramuscolare 36 ore dopo il parto. Tutte le scrofe sono state indotte al parto tramite la somministrazione di prostaglandine 24 ore prima della data presunta del parto, mentre la mattina stessa del parto è stata somministrata ossitocina solo agli animali che non avevano ancora iniziato la fase espulsiva. Le scrofe che hanno partorito durante le ore diurne sono state assistite da un veterinario specializzato. Un sommario pareggiamento delle nidiate è stato effettuato all'interno dei gruppi trattato e controllo per uniformare il peso ed il numero dei suinetti sotto la stessa madre, sebbene cercando di ridurre al minimo gli spostamenti.

Parametri osservati

Sono state registrate le performance di scrofe e nidiate durante il parto: numero di nati vivi, nati morti e mummificati, ordine di parto della scrofa, durata del parto, numero di esplorazioni uterine che si erano rese necessarie, e trattamenti farmacologici aggiuntivi al dinoprost effettuati nelle scrofe.

Dopo tre giorni dal parto, tutte le scrofe hanno ricevuto una visita clinica da parte di un veterinario. I parametri registrati sono illustrati in Tabella 1, e sono stati la temperatura rettale, la frequenza respiratoria, l'ingestione alimentare, gli scoli vaginali, lo stato di infiammazione della mammella, e l'eiezione di latte. La quantità di scoli vaginali è stato valutato tramite una stima del veterinario, mentre l'eiezione del latte è stata stimata tramite la mungitura manuale di un numero rappresentativo di capezzoli (almeno 6) di ciascuna scrofa. I punteggi di ciascun parametro sono poi stati sommati per creare un indice clinico di valutazione globale dell'animale (modificato da Hirsch et al., 2003).

	Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Temperatura rettale (°C)	< 39,5	> 39,5	-	-
Frequenza respiratoria (inalazioni/min)	< 29	30-34	35-39	>40
Ingestione alimentare	Come da curva alimentare programmata	Ridotta fino ad 1/3	Ridotta più di 1/3 ma meno di 3/3	Completa inappetenza
Scoli vaginali	Nessuno scolo patologico	Piccole quantità pari a gocce di scolo patologico	Moderate quantità di scolo patologico	Ingenti quantità/flusso continuo di scolo patologico; espulsione di suinetti nati morti e/o placenta
Infiammazione della ghiandola mammaria	Nessun segno di infiammazione	Leggeri segni di infiammazione	Ovvi segni di infiammazione locale	Severi segni di infiammazione all'intera mammella
Eiezione del latte	Normale flusso del latte	Flusso ridotto con latte a gocce	Flusso interrotto completamente	-

Tabella 1. Descrizione dei punteggi relativi ai parametri clinici valutati nelle scrofe tre giorni dopo il parto.

Table 1. Description of scores on clinical parameters evaluated in sows three days after farrowing.

Per l'analisi dei risultati sono stati creati dei sottogruppi di scrofe a seconda dei parametri osservati prima della somministrazione di dinoprost: durata del parto (breve se < 3h vs rapido); esplorazioni uterine (poche se ≤ 3 vs tante); numero di nati morti (nessuno vs ≥ 1); trattamenti farmacologici aggiuntivi (no vs sì).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La prova ha coinvolto tre bande con cadenza tri-settimanale, la prima con parto in Maggio e l'ultima in Luglio. Le scrofe selezionate per la prova hanno mostrato simili performance durante il parto (ovvero prima della somministrazione del dinoprost), confermando la corretta randomizzazione degli animali nei due gruppi di trattamento. Le performance medie ottenute sono state: durata del parto: 3,53±1,09 ore; numero di esplorazioni uterine: 3,93±1,09; numero di nati vivi: 13,2±3,02; numero di nati morti: 0,22±0,59; numero di nati totali: 13,44±3,21; numero

di suinetti mummificati: 0,91±1,41. I dati clinici delle scrofe raccolti tre giorni dopo il parto sono riportati in tabella 2.

Il parametro clinico che ha evidenziato differenza statistica tra i due gruppi è stato la frequenza respiratoria, che è aumentata nel gruppo trattato con dinoprost. Il risultato sembra trovare conferme a livello bibliografico, essendo le l’aumento della frequenza respiratoria uno dei blandi effetti collaterali osservati a seguito di somministrazione di prostaglandine (Connor et al., 1979). L’assenza di altre differenze tra i dati clinici per la maggior parte delle variabili osservate potrebbe essere dovuta al basso numero di animali coinvolti nella prova. Infatti, non per tutti i gruppi la distribuzione dei dati ha consentito una completa e corretta analisi statistica, suggerendo la necessità di incrementare le osservazioni. Sebbene non fossero previsti ulteriori animali per questa fase preliminare, anche altri autori (Morrow et al., 1996) hanno evidenziato una tendenza statistiche al miglioramento dei dati raccolti a favore del gruppo trattato (anche se riferiti alle performance durante la lattazione ed il parto successivo), suggerendo che un campione più numeroso potrebbe confermare la significatività.

		Controllo (%)	Trattamento (%)	P-value
Temperatura rettale (°C)	Score 1	89,2	81,6	Ns
	Score 2	10,8	18,4	
Frequenza respiratoria (atti inalatori/min)	Score 1	100	89,5	0,04
	Score 2	0	10,5	
	Score 3	Non oss	Non oss	
	Score 4	Non oss	Non oss	
Ingestione alimentare	Score 1	97,3	94,7	Ns
	Score 2	2,7	5,3	
	Score 3	Non oss	Non oss	
	Score 4	Non oss	Non oss	
Scoli vaginali	Score 1	59,5	60,5	Ns
	Score 2	40,5	39,5	
	Score 3	Non oss	Non oss	
	Score 4	Non oss	Non oss	
Infiammazione della mammella	Score 1	56,7	63,1	Ns
	Score 2	35,1	26,3	
	Score 3	8,1	10,5	
	Score 4	Non oss	Non oss	
Eiezione di latte	Score 1	100	92,1	Ns
	Score 2	0	7,9	
	Score 3	Non oss	Non oss	

Tabella 2. Frequenza percentuale delle scrofe che hanno manifestato ciascun punteggio per ciascuna variabile osservata nei due gruppi. Non oss = Nessuna scrofa registrata nello specifico score clinico.

Table 2. Frequency percentage of sows that showed each score for each variable observed in the two groups. Non oss = No sows recorded in the specific clinical score.

Se le analisi tra i due gruppi hanno evidenziato poche differenze significative, l’indagine approfondita nelle sottoclassi ha fatto emergere alcuni differenze che necessitano di un ulteriore approfondimento per ottenere una conferma statistica, i quali suggeriscono che alcune categorie di animali trattate con dinoprost dopo il parto possano avere un beneficio più evidente rispetto alla media di popolazione. Ad esempio, le scrofe che presentano un parto languido e dunque più lungo (> 3 ore) sembrano ridurre lo score clinico legato all’infiammazione della mammella

registrato tre giorni dopo il parto. Allo stesso modo, scrofe che durante il parto avevano richiesto maggiori interventi esplorativi da parte dell’operatore avevano beneficiato del trattamento riducendo gli scoli vaginali post-partum. Infine, gli animali ai quali erano stati somministrati trattamenti farmacologici aggiuntivi al parto hanno ridotto lo score di infiammazione della mammella nel gruppo di trattamento rispetto al controllo.

Alla luce delle ipotesi emerse da questa prima raccolta dati, verranno condotte ulteriori indagini per approfondire e confermare statisticamente i dati. Sembra però che il presente studio suggerisca che il trattamento con dinoprost sia in grado di migliorare alcuni parametri clinici in classi di scrofe problematiche.

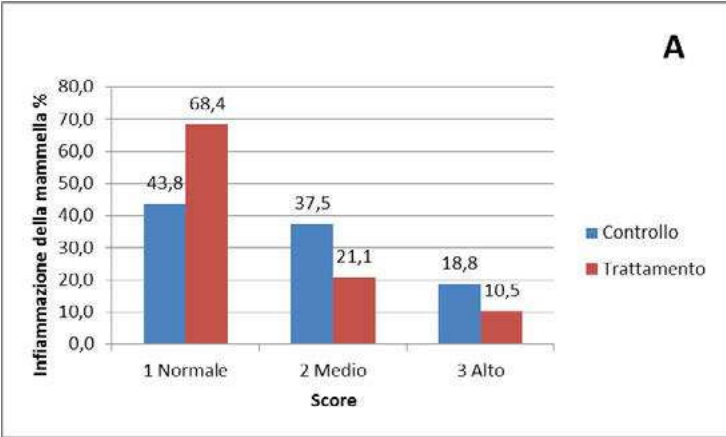


Figura 1A. Rappresentazione grafica dei tre punteggi relativi all’infiammazione della mammella nei gruppi trattato e controllo all’interno del sottogruppo di scrofe che avevano presentato un parto languido (>3 ore).

Figure 1A. Graphic representation of the three scores for inflammation of the breast in the treated and control groups within the subgroup of sows that showed a languid farrowing (> 3 hours).

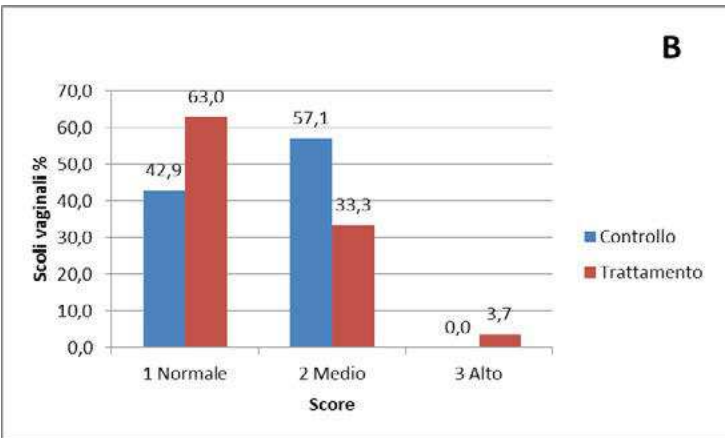


Figura 1B. Rappresentazione grafica dei tre punteggi relativi agli scoli vaginali nei gruppi trattato e controllo all’interno del sottogruppo di scrofe che avevano ricevuto esplorazioni uterine durante il parto.

Figure 1B. Graphic representation of the three scores for vaginal discharge in the treated and control groups within the subgroup of sows that received uterine explorations during farrowing.

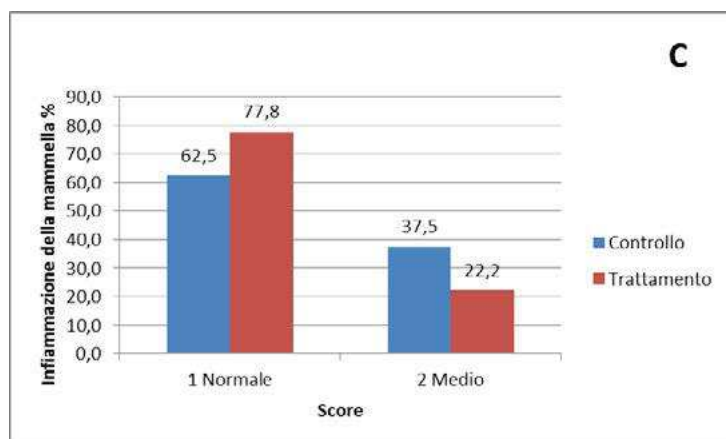


Figura 1C Rappresentazione grafica dei tre punteggi (punteggio 3 non raggiunto in nessuno dei due gruppi) relativi all'infiammazione della mammella nei gruppi trattato e controllo all'interno del sottogruppo di scrofe che avevano ricevuto esplorazioni uterine durante il parto.

Figure 1C. Graphic representation of the three scores (score 3 never obtained neither in control nor in treated group) for inflammation of the breast in the treated and control groups within the subgroup of sows that received uterine explorations during farrowing.

BIBLIOGRAFIA

- Connor, L., Phillips, G. D., & Palmer, W. M. (1976). Effects of prostaglandin F2 α on the estrous cycle and hormone levels in the gilt. *Canadian Journal of Animal Science*, 56(4), 661-669.
- De Passillé, A. M., Rushen, J., Foxcroft, G. R., Aherne, F. X., & Schaefer, A. (1993). Performance of young pigs: relationships with periparturient progesterone, prolactin, and insulin of sows. *Journal of animal science*, 71(1), 179-184.
- Dial, G. D. (1984). Clinical applications of prostaglandins in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 185(12), 1523.
- Gil, J., Pallas, R.T., Noval, R., del Pozo, M. (1990). Treatment of vaginal discharges in the sows with PGF2 α in post-farrowing period. *Proc 11th IPVS Congress. Lausanne, Switzerland. 1990*;477.
- Morrow, W. M., Britt, J., Belschner, A., Neeley, G., & O'Carroll, J. (1996). Effect of injecting sows with prostaglandin F2 α immediately postpartum on subsequent reproductive performance. *Swine Health Prod*, 4, 73-78.

PREMIO GUADAGNINI 2017

**ALLEVAMENTO E MACELLAZIONE DEL SUINO PESANTE:
CORRELAZIONE TRA LA QUALITÀ DELLA CARNE E IL
GRADO DI BENESSERE**

***CORRELATION BETWEEN MEAT QUALITY AND WELFARE
LEVEL: THE CASE OF ITALIAN HEAVY PIGS***

BACCHI R.¹, NANNONI E.¹, SARDI L.¹, BERTOLINI A.², BORCIANI M.³,
GASTALDO A.², GORLANI E.², ROSSI A.³

¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna
Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano Emilia (BO), Italy;*

²*Fondazione C.R.P.A. Studi Ricerche - Reggio Emilia
Viale Timavo 43/2, 42121, Reggio Emilia, Italy;*

³*C.R.P.A. Spa - Reggio Emilia - Viale Timavo 43/2, 42121, Reggio Emilia, Italy.*

Parole chiave: suino, carne, benessere animale

Key words: pig, meat, animal welfare

Riassunto

Scopo della presente ricerca è stato quello d'indagare le relazioni esistenti fra il benessere degli animali durante le fasi di allevamento e trasporto e la qualità delle carni da essi ottenute.

La sperimentazione è stata condotta su 44 partite di suini pesanti provenienti da 11 allevamenti siti in Emilia Romagna e selezionati casualmente. Il benessere animale è stato valutato dal Centro Ricerche e Produzioni Animali (CRPA) di Reggio-Emilia attraverso un sistema da loro implementato: per ogni allevamento è stato calcolato l'Indice di Benessere dell'Allevamento (IBA) e per ogni partita di macellazione l'Indice di Benessere del Trasporto e della pre-Macellazione (IBTM). Da 440 animali (10 per partita) è stato prelevato un campione di sangue alla giugulazione su cui sono state determinate le concentrazioni di creatinichinasi (CK), aldolasi e cortisolo. Dai medesimi animali sono stati poi prelevati campioni di lombo su cui sono stati misurati pH, colore strumentale, potere di ritenzione idrica e resistenza al taglio.

I risultati dell'analisi statistica hanno evidenziato che il miglioramento del benessere influenza in positivo la qualità della carne: in tal senso l'effetto più importante non è dovuto alle condizioni d'allevamento, bensì a quelle di trasporto e macellazione. Nello specifico i punti critici individuati dal nostro studio sono rappresentati dal prolungamento del tempo di trasporto e dalla commistione di animali provenienti da gruppi sociali diversi.

Abstract

The present study investigated the relationships between the welfare of pigs (on farm, during transport and before slaughtering) and the quality of the derived meat.

The experimental trial was carried out on 44 slaughtering batches of heavy pigs, coming from 11 farms located in Emilia Romagna and randomly selected. Animal welfare was assessed by the Research Centre on Animal Production (Italian initials CRPA) of Reggio Emilia, according to a welfare assessment protocol they have implemented. According to this protocol, each farm was scored for the Farm Welfare Index (Italian initials IBA), and each slaughtering batch was scored for the Transport and pre-Slaughter Welfare Index (Italian initials IBTM).

Blood samples were collected upon exsanguination from 440 pigs (10 per slaughtering batch). Cortisol, creatin kinase (CK) and aldolase concentrations were analyzed on plasma. Loin samples were collected from the same animals, and used for meat quality evaluations (pH, instrumental colour, water holding capacity, shear force).

The results of the statistical analysis underlined that an increase in welfare level had a positive effect on meat quality; transport and pre-slaughtering procedures had the most important effects, whereas the level of welfare on farm had a lower effect. The critical points observed in this study were represented by the increase in journey duration and the mixing of pigs from different social groups during transport and lairage.

INTRODUZIONE

Negli anni i consumatori hanno sviluppato una crescente sensibilità nei confronti del benessere animale, che è quindi diventato un’esigenza implicita al momento dell’acquisto di un prodotto ☐ la carne, affiancandosi ad altre esigenze più esplicite (caratteristiche organolettiche, tecnologiche, nutrizionali e salubrità) (Pecorino, 2009).

Tra benessere animale e qualità della carne sussiste una correlazione: è infatti noto come una diminuzione del benessere si traduca in stress, condizione capace di causare alterazioni nella qualità della carne. In particolare, lo stress subito dagli animali durante le fasi di trasporto e macellazione, può dar luogo a stimolazione contrattile della muscolatura e risposte neuro-endocrine in grado di inficiare l’acidificazione della carne nel post-mortem (Mench, 2004): in dettaglio è risaputo che un incremento della cortisolemia sia generalmente indice di stress acuti (Debenedetti, 2008), un aumento del tasso ematico della CPK risulti correlato a traumi muscolari, sforzo fisico intenso (Hoffmann et al., 2008), e lotte tra animali (Brant et al., 2015), e che un innalzamento dei livelli plasmatici dell’aldolasi sia consequenziale a trasporti prolungati o danni muscolari (Adenkola ed Ayo, 2010).

Risulta quindi necessario trovare un compromesso tra compassione e convenienza, riconoscendo che un aumentato livello di benessere degli animali si traduca in un incremento della qualità delle produzioni e dei profitti (Gregory, 1998).

Mentre le caratteristiche organolettiche e tecnologiche della carne possono essere agevolmente stimate mediante precise rilevazioni strumentali, la valutazione del benessere appare una questione più composita e di più ostica attuazione.

Nel corso del tempo si sono susseguiti vari tipi di approccio al problema e negli ultimi anni, in molti paesi europei, si è diffuso l’utilizzo di scoring systems basati sulla compilazione di checklists tali da rendere più agevole e immediata la stima del benessere in azienda. Tale metodologia è stata ideata sulla base della Direttiva 98/58/CE, recante le norme minime per la protezione degli animali in allevamento, e si fonda sull’utilizzo sia di animal criteria che di design criteria.

Recentemente sono stati proposti dal CRPA i sistemi IBA (Indice di Benessere dell’Allevamento) e IBTM (Indice di Benessere del Trasporto e della pre-Macellazione): questi sono indici aziendali strutturati in checklists basate sulla valutazione di standard tecnici e sul riscontro di eventuali non conformità alla normativa vigente in materia di benessere (Direttive 98/58/CE e 2008/120/CE).

L’IBA è un sistema applicabile a più specie animali e indirizzi produttivi, imperniato su criteri obiettivi e facilmente misurabili in azienda quali ad esempio: sistemi di allevamento e stabulazione, alimentazione e acqua di bevanda, igiene, sanità e comportamento degli animali, ecc. (Rossi et al., 2009).

L’IBTM invece è un sistema mirato a raccogliere evidenze relative alle fasi di movimentazione dei suini dalle porcilaie ai mezzi di trasporto, viaggio, scarico e ricovero degli animali presso gli impianti di macellazione.

I dati così raccolti vengono infine elaborati tramite un programma che restituisce un punteggio finale di benessere e una classe IBA o IBTM nella quale collocare l’azienda in esame (Gastaldo et al. 2013).

MATERIALI E METODI

La ricerca ha coinvolto 11 allevamenti siti in Emilia Romagna e selezionati casualmente, ed è stata condotta su 44 partite di suini pesanti (4 partite per allevamento), per un totale di 440 suini

(10 suini per partita). Per ogni allevamento è stato calcolato il punteggio IBA, per ogni partita di macellazione è stato invece valutato l’IBTM.

Per riscontrare eventuali influenze stagionali, ogni allevamento è stato campionato 4 volte: 2 durante il periodo aprile-settembre e 2 durante il periodo ottobre-marzo.

Alla macellazione, avvenuta presso il macello Italcarni di Castelfranco Emilia (MO), da 10 animali per ogni partita sono stati prelevati campioni di sangue alla giugulazione e di muscolo *Longissimus lumborum*.

IBA Suini – Indice di Benessere dell’Allevamento suinicolo

Le checklists IBA sono adattabili a qualsiasi tipo di allevamento suinicolo (a ciclo aperto o chiuso, da riproduzione o da ingrasso) e le schede tengono conto di svariati parametri oggettivi e facilmente misurabili durante il sopralluogo aziendale (tabella 1). Il punteggio totale IBA è costituito dalla sommatoria di 3 punteggi parziali relativi ai dati generali dell’azienda, alle unità/sale, alle categorie suine presenti e ai settori dell’allevamento.

Tabella 1- Tipo di schede previste dal sistema di valutazione IBA suini e parametri considerati (da Rossi et al., 2009 e Barbari et al., 2008, modificata).

Table 1 – Forms and examples of parameters to be evaluated according to the IBA checklists for pigs (Rossi et al., 2009 and Barbari et al., 2008, modified).

Codice	Tipo scheda	Parametri
A	Parte generale – allevamenti da riproduzione	Dati generali sull’azienda, e sull’allevamento, sulla gestione degli animali, controllo di strutture e registrazioni, staff, strutture per quarantena e isolamento.
AA	Parte generale – allevamenti da ingrasso	
B	Unità/sala (Unità = unità di edificio senza suddivisioni in sale, ospitante una o più categorie di suini. Sala = sala (suddivisione di una unità) ospitante una sola categoria di suini.)	Categorie di suini presenti, caratteristiche dei ricoveri, controllo del microclima, pulizia e stato interno degli edifici e delle attrezzature.
C	Settore di fecondazione/gestazione (Per scrofe/scrofette da fecondare e gestanti e per verri)	Sistema di stabulazione, disponibilità di spazio, sistemi di alimentazione e abbeverata, caratteristiche delle aree funzionali (di alimentazione, di riposo e di escrezione delle deiezioni), pavimentazione, controllo del microclima, aspetti igienici, sanitari e comportamentali.
D	Settore di maternità (Per scrofe allattanti e lattonzoli)	
E	Settore di svezzamento	
F	Settore d’ingrasso o rimonta (Per suini nella fase d’ingrasso o per scrofette/verretti da rimonta)	

Il sistema di elaborazione dati attribuisce una classe IBA a ciascuna azienda, collocandola in una delle seguenti 6 classi a livello di benessere crescente:

- Classe 1: non conforme;
- Classe 2: scarso;
- Classe 3: sufficiente;
- Classe 4: discreto;
- Classe 5: buono;
- Classe 6: ottimo.

Per la fase d’ingrasso gli elementi discriminanti per l’assegnazione della classe IBA sono il punteggio totale IBA, la presenza di non conformità e la rilevazione di punteggi negativi.

IBTM – Indice di Benessere del Trasporto e della pre-Macellazione

La checklist si compone di tre schede di valutazione.

- Scheda Allevamento, compilata durante il trasferimento dei suini dalle porcilaie ai veicoli di trasporto. Tiene conto di: durata dell’operazione di carico, percorso dal box al mezzo di trasporto, comportamento del personale, strumenti utilizzati per la movimentazione, comportamento dei suini.
- Scheda Trasporto, compilata durante il viaggio sul mezzo di trasporto. Vengono considerati ~~dati del~~ trasportatore, durata e lunghezza del viaggio, superficie disponibile/capo, numero di abbeveratoi, ventilazione, raffrescamento, altre caratteristiche del veicolo.
- Scheda Macello, raccoglie dati relativi alle fasi di scarico e di attesa pre-macellazione. Vengono stimati ad esempio: durata dello scarico, durata dell’attesa pre-macellazione, percorso dal camion alla stalla di sosta e da questa alla zona di stordimento, comportamento del personale, strumenti impiegati per la movimentazione, numero di suini che si scavalcano, scivolano o cadono, caratteristiche della stalla di sosta e della zona di stordimento.

Sono previste 5 classi IBTM a livello di benessere crescente:

- Classe 1: scarso (IBTM <= 0);
- Classe 2: sufficiente (IBTM > 0);
- Classe 3: discreto (IBTM >10);
- Classe 4: buono (IBTM >20);
- Classe 5: ottimo (IBTM > 30).

Parametri fisiologici

Il sangue campionato in sede di macellazione è stato trasferito presso il Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell’Università di Bologna, dove è stato centrifugato. Il plasma ottenuto, conservato a -20°C, è stato successivamente sottoposto alle determinazioni analitiche di seguito elencate.

- *Dosaggio radioimmunologico del cortisolo*: la concentrazione plasmatica del cortisolo (indicatore di stress acuto) è stata valutata mediante saggio radioimmunologico, secondo la metodica descritta da Tamanini et al. (1983). La concentrazione viene espressa in ng/ml.
- *Creatinchinasi (CK)*: il suo tasso ematico aumenta in caso di danno muscolare o intensa attività fisica. Può quindi essere utilizzata come indicatore di benessere (Broom, 2014). La determinazione è stata condotta utilizzando un kit commerciale (CK Nac Liquid, Sentinel Diagnostics, Milano) che prevede la determinazione su plasma tramite doppia lettura spettrofotometrica (UV). La concentrazione viene espressa in U/l.
- *Aldolasi*: l’aldolasi nel plasma aumenta in seguito a trasporti prolungati o danni muscolari, rappresenta quindi un indicatore di stress durante il trasporto o le fasi di carico/scarico. La sua attività plasmatica è stata misurata tramite un kit commerciale (Aldolase, Sentinel Diagnostics, Milano) che prevede la determinazione tramite doppia lettura spettrofotometrica (UV). La concentrazione viene espressa in U/l.

Qualità delle carcasse e delle carni

La percentuale di carne magra delle carcasse è stata misurata tramite Fat-o-Meater (F-o-M, SFK, Copenhagen, DK). A 45 minuti *post-mortem* è stato misurato il pH del muscolo *Longissimus lumborum* utilizzando un pH-metro portatile (modello 250A, Orion Research, Boston, MA). Sono stati prelevati dei campioni di muscolo *Longissimus lumborum*, che sono stati immediatamente trasferiti presso il laboratorio di Produzioni Animali e Sicurezza Alimentare (SPASA) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell’Università di Bologna. In laboratorio sono stati determinati:

- *pH*, rilevato a 24 ore dalla macellazione mediante pH-metro portatile (modello 250A, Orion Research, Boston, MA);
- *colore strumentale*, misurato alla ricezione del campione mediante colorimetro Minolta CR-200;
- *capacità di ritenzione idrica*, determinata su carne cruda (drip loss) e su carne cotta (cooking loss), secondo le Procedure Operative Standard (SOP) del DIMEVET;
- *tenerezza strumentale*, misurata come resistenza al taglio (Warner-Bratzler Shear Force) rilevata mediante tessurometro Instron modello 1011. Viene espressa in kg/cm².

Analisi statistica

I diversi parametri rilevati sono stati oggetto di verifica della distribuzione normale con test di Kolmogorov-Smirnov e successivamente sottoposti ad analisi della varianza a una via in funzione degli indici IBA e IBTM, della stagionalità e dei principali parametri legati a trasporto e macellazione (durata del trasporto, attesa pre-macellazione, rimescolamento dei gruppi). Sono stati infine valutati i coefficienti di correlazione tra punteggio IBA, IBTM e totale e i parametri fisiologici e di qualità delle carni.

Le valutazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., 2011).

RISULTATI

Il punteggio IBA delle aziende valutate per questo studio (tabella 2) risulta essere fisso: nel periodo d’indagine infatti non sono state eseguite modifiche aziendali che potessero causarne una variazione. Di contro, il punteggio IBTM varia per ogni partita in funzione dei parametri stessi che lo costituiscono (alcuni di questi sono riportati nella successiva tabella 3). Conseguentemente anche per il punteggio totale, così come per il punteggio IBTM, oltre alla media si forniscono anche i valori minimo e massimo.

Tabella 2 – Punteggio IBA, IBTM (media, minimo e massimo) e TOTALE (IBA + IBTM) delle 11 aziende coinvolte nello studio.

Table 2 – IBA, IBTM (average, minimum and maximum) and TOTAL (IBA + IBTM) score of the 11 farms involved in the study.

Azienda	IBA	IBTM			TOTALE		
		Media	Min	Max	Media	Min	Max
A	39.8	35.1	33.5	36.5	74.9	73.3	76.3
B	35.1	33.6	27.5	42.0	68.7	62.6	77.1
C	44.4	27.8	26.0	30.0	72.2	68.2	74.4
D	31.7	37.5	36.5	40.0	69.2	68.2	71.7
E	32.5	35.6	34.0	37.0	68.1	66.5	69.5
F	30.8	32.0	29.5	34.5	62.8	60.3	65.3
G	27.1	32.1	31.0	33.0	59.2	58.1	60.1
H	20.5	35.3	33.5	37.5	55.8	54.0	58.0
I	33.5	31.0	28.5	34.5	64.5	62.0	68.0
L	29.4	29.3	28.0	31.0	58.7	57.4	60.4
M	22.7	33.0	31.0	35.5	55.7	53.7	55.7

Tabella 3 – Parametri utilizzati nel calcolo del punteggio IBTM delle 11 aziende coinvolte (media ± deviazione standard).

Table 3 – Parameters used for the calculation of the IBTM score for the 11 farms involved (average ± standard deviation).

Azienda	Velocità carico animali	Distanza dal macello	Durata viaggio	Velocità scarico animali	Durata totale trasporto(*)	Durata attesa pre-abbattimento
	(suini/ora)	(km)	(minuti)	(suini/ora)	(minuti)	(minuti)
A	180.3±28.2	18.0±0.0	26.8±4.6	382.3±47.5	106.5±20.2	452.5±439.6
B	125.3±10.1	22.5±5.0	30.5±9.5	436.8±66.4	157.5±16.2	348.5±621.2
C	199.0±31.7	12.3±1.2	18.7±1.2	372.0±60.6	143.7±9.3	269.7±46.6
D	90.3±19.6	50.0±6.2	74.0±10.8	317.3±85.1	166.5±8.58	440.0±549.9
E	246.0±56.9	25.0±0.0	37.3±15.6	414.0±182.2	124.8±31.4	868.3±558.1
F	159.0±13.9	39.5±1.0	67.0±15.6	545.0±222.2	168.0±17.0	886.0±528.5
G	198.5±30.1	39.8±1.5	39.8±4.27	403.0±91.7	101.0±13.4	131.5±73.7
H	240.4±80.5	25.6±0.6	32.4±3.3	511.8±92.9	126.8±14.3	1149.0±192.3
I	85.8±12.5	21.0±0.0	36.8±8.4	484.0±101.0	187.5±12.8	818.0±544.9
L	164.3±28.6	16.0±0.0	20.3±1.3	480.0±137.3	113.0±11.3	158.0±118.1
M	166.8±23.0	15.3±0.5	22.8±7.2	380.8±108.8	102.5±21.4	479.8±613.9

*(carico + attesa viaggio +viaggio + attesa scarico + scarico)
*(loading + waiting before the journey + journey + waiting before unloading + unloading)

La velocità di carico degli animali varia notevolmente tra le diverse aziende, con valori molto bassi per le aziende D e I (< a 100 suini/ora) e molto elevati per le aziende E ed H (> 240 suini/ora). In alcuni casi si osservano variazioni intraziendali in funzione della diversa giornata (si veda la deviazione standard delle aziende E ed H). Le aziende presentavano distanze dal macello variabili tra i 12 e i 50 km, di conseguenza la durata del viaggio varia da 20 minuti (aziende C, L e M) a oltre 1 ora (aziende D e F). Per quanto concerne la velocità di scarico degli animali in macello, sussiste una discreta variabilità sia interaziendale (per es. azienda D vs. azienda F) sia intraziendale (si veda la deviazione standard delle aziende E e F). Anche per la durata totale del trasporto esiste una buona variabilità, con un minimo di 101 minuti per l’azienda G e un massimo di 187 minuti per l’azienda I. Infine, anche il tempo trascorso tra lo scarico degli animali e l’abbattimento mostra ingenti differenze, che rispecchiano la possibilità che la macellazione sia avvenuta nella medesima giornata in cui è stata compiuta la consegna o in quella successiva. In tabella 4 vengono riportati, per ogni azienda, le dimensioni dei carichi effettuati e l’eventuale rimescolamento degli animali durante il trasporto e l’attesa pre-macellazione. Per quanto attiene alle dimensioni dei carichi (o partite) di animali, considerando le caratteristiche “standard” dei mezzi di trasporto, si è deciso d’indicare se venisse riempita solo la motrice (circa 70 animali) o la motrice e il suo rimorchio (circa 140 animali). Si rileva pertanto che 4 allevamenti (A, C, G e M), aventi dimensioni più ridotte, fornivano partite di animali meno numerose, tali da riempire la sola motrice. I restanti allevamenti disponevano invece di partite di numerosità sufficiente per riempire sia la motrice che il rimorchio.

In quanto alla possibilità o meno di mantenere gli animali in gruppi uguali a quelli di allevamento, solo 4 aziende hanno mantenuto, per tutte le consegne, gli animali col medesimo gruppo formato in allevamento. Per altri 3 allevamenti invece ciò è avvenuto 3 volte su 4.

Tabella 4 – Mantenimento dei gruppi di allevamento nelle fasi successive e caratteristiche del trasporto.

Table 4 – Preservation of farm groups in the subsequent phases and characteristics of the trucks used.

Azienda	Caratteristiche trasporto	Mantenimento gruppi (% sul totale dei 4 trasporti)		
		Mai	Solo trasporto	Trasporto + attesa
A	Solo motrice	0	0	100
B	Motrice + rimorchio	100	0	0
C	Motrice + rimorchio	50	50	0
D	Solo motrice	0	0	100
E	Motrice + rimorchio	0	0	100
F	Motrice + rimorchio	25	0	75
G	Solo motrice	0	25	75
H	Motrice + rimorchio	0	0	100
I	Motrice + rimorchio	25	0	75
L	Motrice + rimorchio	100	0	0
M	Solo motrice	25	25	50

Da rilevare come per gli animali la cui macellazione avveniva il giorno successivo alla consegna (aziende E, F, H, I; dato ricavabile dalla durata d’attesa pre-abbattimento in tabella 3) ha prevalso la possibilità di mantenere i gruppi originari. Per ciò che riguarda gli effetti di trasporto e attesa pre-macellazione sulla qualità della carne e sugli indicatori fisiologici di stress, sono stati effettuati dei confronti considerando alcune variabili che, anche in base a quanto riportato in tabella 3, potevano esercitare una certa influenza. Oltre all’effetto della stagione, i dati sono stati elaborati anche in funzione di attesa pre-macellazione, durata del trasporto e possibilità di mantenere o meno i gruppi originari. L’attesa pre-macellazione è stata divisa in 2 classi: attesa bassa (< a 6 ore) per animali macellati il giorno della consegna e attesa alta (> a 15 ore) se macellati il giorno dopo. Per quanto concerne la durata totale del trasporto sono state create 3 classi: trasporto breve (tra 80 e 120 minuti), trasporto medio (tra 120 e 160 minuti) e trasporto lungo (tra 160 e 200 minuti). Infine, in riferimento al mantenimento dei gruppi, l’elaborazione è avvenuta in funzione delle 3 classi già identificate in tabella 4: mai mescolati, mescolati nelle stalle di sosta, mescolati fin dal trasporto. I risultati sono riportati nelle tabelle 5 e 6. Nella tabella 7 si esprimono i coefficienti di correlazione tra punteggi IBA, IBTM e punteggio totale e i parametri fisiologici e qualitativi.

Tabella 5 – Influenza di alcuni parametri legati a trasporto e macellazione sulla qualità della carne (a,b,c p<0.05; A,B,C p<0.01).

Table 5 – Effects on meat quality of some parameters connected with transport and slaughtering (a,b,c p<0.05; A,B,C p<0.01).

	F-o-M	pH45'	pH24h	Drip Loss (%)	Cooking Loss (%)	Instron (kg/cm²)	L	Tinta	Croma
<u>Stagione</u>									
Calda (>18°C)	48.96	5.96	5.50	1.10	27.14 ^A	3.69 ^B	49.12 ^A	0.91	6.68
Fredda (<15°C)	48.16	6.47	5.52	1.09	25.48 ^B	4.08 ^A	47.03 ^B	0.88	6.42
<u>Attesa pre-macellazione</u>									
Bassa (<6 ore)	48.69	5.98	5.52	1.16 ^A	26.15	3.79	48.09	0.91	6.29 ^B
Alta (>15 ore)	48.36	6.56	5.51	0.99 ^B	26.52	4.03	48.04	0.87	6.92 ^A
<u>Durata trasporto</u>									
Breve (80-120')	47.54	5.96	5.56 ^c	1.13	24.92 ^a	4.04 ^b	46.95 ^A	0.87	6.42 ^a
Medio (120-160')	49.35	6.07	5.51 ^b	1.10	27.18 ^b	4.03 ^b	47.41 ^A	0.92	6.11 ^a
Lungo (160-200')	48.49	6.56	5.48 ^a	1.05	26.42 ^b	3.63 ^a	49.55 ^B	0.88	7.08 ^b
<u>Mantenimento gruppi</u>									
Mai	49.70	6.05	5.52	1.14	26.69	3.91 ^A	46.59 ^C	0.93 ^A	5.73 ^B
Solo trasporto	48.88	6.02	5.52	1.24	26.09	3.23 ^B	51.94 ^A	0.91 ^{AB}	7.27 ^A
Trasporto + stalle sosta	47.95	6.33	5.51	1.05	26.15	3.98 ^A	48.21 ^B	0.87 ^B	6.84 ^A

Tabella 6 – Influenza di alcuni parametri legati a trasporto e macellazione sui parametri fisiologici rilevati (a,b p<0.05; A,B p<0.01).

Table 6 – Influence on physiological parameters of some factors connected with transport and slaughtering (a,b p<0.05; A,B p<0.01).

		Cortisolo (ng/ml)	CK (U/l)	Aldolasi (U/l)
<u>Stagione</u>				
Calda (>18°C)		13.47	2185.90	54.48
Fredda (<15°C)		12.87	2198.82	53.44
<u>Attesa pre-macellazione</u>				
Bassa (<6 ore)		12.09 ^B	2320.49 ^A	58.11 ^a
Alta (>15 ore)		14.70 ^A	2013.12 ^B	48.13 ^b
<u>Durata trasporto</u>				
Breve (80-120')		10.90 ^a	2072.31 ^b	48.02 ^b
Medio (120-160')		13.64 ^b	2012.24 ^b	49.44 ^b
Lungo (160-200')		14.36 ^b	2463.43 ^a	63.10 ^a
<u>Mantenimento gruppi</u>				
Mai		13.00	2561.66 ^A	63.55 ^A
Solo trasporto		11.90	2172.46 ^{AB}	57.61 ^{AB}
Trasporto + stalle sosta		13.44	2014.94 ^B	48.79 ^B

Tabella 7 – Correlazioni tra punteggio IBA, IBTM e totale e i parametri fisiologici e qualitativi (le correlazioni statisticamente significative sono evidenziate in grassetto).

Table 7 – Correlation coefficients between IBA, IBTM and total scores and the physiological and qualitative parameters (statistically significant correlations are shown in bold characters).

	Punteggio IBA	Punteggio IBTM	Punteggio Totale
F-o-M	0.1975 P=0.001	-0.1360 P=0.005	0.1223 P=0.011
Ph45'	0.0120 P=0.805	0.0458 P=0.345	0.0352 P=0.469
Ph24h	0.1371 P=0.005	-0.1103 P=0.023	0.0769 P=0.113
Drip loss	0.0231 P=0.635	0.0436 p=0.369	0.0448 P=0.357
Cooking loss	0.0468 P=0.335	0.0304 P=0.531	0.0611 P=0.208
Instron	-0.0855 P=0.068	0.0380 P=0.434	-0.0666 P=0.170
<u>Colore</u>			
L	-0.0766 P=0.115	0.1461 P=0.003	0.0004 P=0.993
Tinta	0.0313 P=0.520	0.0618 P=0.203	0.0621 P=0.201
Croma	-0.0982 P=0.043	0.0749 P=0.123	-0.0571 P=0.240
<u>Parametri ematici</u>			
Cortisolo	0.0810 P=0.095	0.0923 P=0.057	0.1261 P=0.009
CK	0.2691 P=0.001	-0.1381 P=0.004	0.1909 P=0.001
Aldolasi	0.2563 P=0.001	-0.1883 P=0.001	0.1527 P=0.002

Le tabelle 8 e 9 riportano gli effetti della classe IBA e IBTM (e del punteggio totale) su tali parametri.

Tabella 8 – Influenza del punteggio IBA, IBTM e totale sulla qualità della carne (a,b p<0.05).

Table 8 – Influence of IBA, IBTM and total scores on meat quality (a,b p<0.05).

	F-o-M	Ph 45'	Ph 24h	Drip loss	Cooking loss	Instron	L	Tinta	Croma
<u>IBA</u>									
(sufficiente-discreto)	48.38	5.98	5.50	1.08	26.47	4.02 ^a	47.54	0.88	6.49
5-6 (buono-ottimo)	48.72	6.44	5.52	1.11	26.15	3.77 ^b	48.56	0.91	6.61
<u>IBTM</u>									
4 (buono)	50.05	6.06	5.52	1.02	26.66	3.87	46.50 ^a	0.90	5.96
5 (ottimo)	48.05	6.27	5.51	1.12	26.18	3.89	48.59 ^b	0.89	6.75
<u>Punteggio totale</u>									
8-9 (sufficiente-discreto)	48.54	5.99	5.51	1.04	26.31	3.93	47.66	0.89	6.47
10-11 (buono-ottimo)	48.58	6.53	5.52	1.16	26.29	3.83	48.62	0.90	6.66

Tabella 9 – *Influenza del punteggio IBA, IBTM e totale su alcuni parametri fisiologici (a,b p<0.05; A,B p<0.01).*

Table 9 – *Influence of IBA, IBTM and total scores on some physiological parameters (a,b p<0.05; A,B p<0.01).*

		Cortisolo	CK	Aldolasi
<u>IBA</u>				
(sufficiente-discreto)		12.48 ^a	2162.84	47.50 ^A
5-6 (buono-ottimo)		14.28 ^b	2863.41	59.98 ^B
<u>IBTM</u>				
4 (buono)		12.83	2731.92	66.72 ^b
5 (ottimo)		13.62	2458.64	49.69 ^a
<u>Punteggio totale</u>				
8-9 (sufficiente-discreto)		13.45	2153.15 ^a	50.07 ^a
10-11 (buono-ottimo)		13.37	3026.16 ^b	59.25 ^b

Va specificato che per quanto attiene al punteggio IBA tutte le aziende presentano un punteggio che permette di inserirle nelle classi comprese tra sufficiente (3) ed ottimo (6). Per semplicità, ai fini dell’elaborazione dei dati, si sono ridotte le classi IBA riunendo le aziende di classe 3 e 4 (livello di benessere sufficiente e discreto) e quelle di classe 5 e 6 (livello di benessere buono e ottimo). Per il punteggio IBTM le aziende sono tutte rientrate nelle classi buono (4) e ottimo (5). Anche per il punteggio totale sono state create 2 sole categorie di benessere: sufficiente/ discreto e buono/ottimo.

DISCUSSIONE

Nello studio sono state volutamente inserite aziende aventi valori di punteggio IBA estremi (minimo per le aziende H e M e massimo per le aziende A e C), al fine di evidenziare un’eventuale relazione tra tali punteggi limite e i corrispettivi valori dei parametri fisiologici e di qualità della carne analizzati. Il punteggio IBTM invece, nell’ambito del confronto interaziendale, denota una minor variabilità: il gap che intercorre tra l’azienda con punteggio medio più alto e quella con punteggio più basso non supera infatti i 10 punti, a differenza di quanto rilevato, come già detto, per il punteggio IBA. Per ciò che concerne il punteggio IBTM intraaziendale, esso mostra una variabilità nel complesso limitata poiché il divario maggiore rilevato tra valore massimo e minimo di una stessa azienda è risultato essere inferiore ai 6 punti (azienda B). Va infine sottolineato come non sussista nessuna relazione diretta tra punteggio IBA e punteggio IBTM: ad esempio si osserva infatti come l’azienda C, detentrica del punteggio IBA più elevato, sia al contempo anche quella che possiede il punteggio IBTM più basso. A questo punto si rivela utile analizzare nel dettaglio le peculiarità dei singoli parametri impiegati nel calcolo del punteggio IBTM. Il fattore “velocità di carico degli animali” appare fortemente influenzato da strutture e attrezzature predisposte dalle singole aziende per il carico stesso (corridoi di raccolta,

caratteristiche delle rampe di carico, ecc.) ma anche dalle capacità professionali del personale aziendale e dei trasportatori. Anche l’apprezzabile variabilità intraaziendale e interaziendale del parametro “velocità di scarico degli animali in macello” è attribuibile a diversi elementi: pur trattandosi sempre della medesima struttura di macellazione, possono risultare fortemente impattanti il personale presente, il tipo di camion (solo motrice o motrice + rimorchio) e l’abilità dell’autista del mezzo. Il parametro “durata totale del trasporto”, come vedremo in seguito, riveste poi un ruolo interessante come possibile indicatore di stress. Tale fattore, oltre a tenere conto del tempo di carico e scarico dei suini e della durata del viaggio, è influenzato anche dal tempo passato sul camion che intercorre tra il carico e l’inizio del viaggio, e tra l’arrivo in macello e l’inizio dello scarico. Nel complesso, si rileva come la nostra prova abbia osservato durate di viaggio piuttosto brevi, e come la variabilità nella durata totale del trasporto sia solo in parte giustificata dalle diverse distanze delle aziende dal macello. In merito al tempo trascorso tra lo scarico degli animali e l’abbattimento, le ingenti differenze di valori non devono invece stupire, poiché rispecchiano la possibilità che la macellazione sia avvenuta nella medesima giornata in cui è stata realizzata la consegna o in quella successiva, a seconda del momento della giornata in cui è stata compiuta la consegna stessa. Infatti, per gli animali consegnati di prima mattina, l’abbattimento avviene di solito entro le 6 ore seguenti (con attese minime di soli 30 minuti per alcune consegne), per i suini consegnati il pomeriggio invece, l’abbattimento si effettua normalmente la mattina dopo e in tal caso l’attesa supera le 15 ore. A questo proposito va sottolineato come per alcune aziende (B, D, E, F, I e M) alcune consegne siano state macellate in giornata, mentre altre siano state posticipate al giorno dopo (come manifestato dall’elevata deviazione standard del dato in esame). Ai fini della valutazione dello stress pre-macellazione, l’opportunità di mantenere o meno gli animali in gruppi uguali a quelli di allevamento costituisce indubbiamente un aspetto cruciale: è risaputo infatti che la commistione di suini appartenenti a gruppi diversi scatena lotte gerarchiche che causano stress, e quindi innalzamento dei parametri fisiologici ad esso correlati (Knowles et al., 2014). Riguardo a ciò, la possibilità di non mescolare gruppi diversi di animali è fortemente dipendente dalle dimensioni dei box dell’allevamento di provenienza: solo gruppi costituiti da un numero di suini compreso tra 15 e 25 possono essere mantenuti durante trasporto e stabulazione nei locali del macello. Gruppi più piccoli o più grandi (questi ultimi tipici di allevamenti più vetusti) subiscono necessariamente un rimescolamento o ridimensionamento/suddivisione in gruppi più esigui, alterando la stabilità gerarchica del gruppo stesso. Per quanto attiene ai parametri qualitativi della carne, si è tenuto conto dell’influenza esercitata su di essi da alcuni fattori legati a trasporto e macellazione: in tal senso gli effetti maggiori si riscontrano a carico del colore, legato principalmente a modificazioni dei parametri L e croma, a loro volta condizionati da durata dell’attesa pre-macellazione, durata del trasporto e mantenimento dei gruppi. In particolare si è osservato come durata del trasporto medio-breve, mantenimento di gruppi uguali a quelli d’allevamento e attesa pre-macellazione breve non provochino alterazioni del colore della lombata. L’aumento della durata del trasporto invece ha influenzato negativamente il pH a 24 ore (causando una maggiore acidificazione delle carni), con conseguente aumento del valore di L (verosimilmente dovuto a un aspetto più lucido e bagnato). Tale variazione del pH è in accordo con quanto osservato da Martocchia et al. (1995), che hanno confrontato gli effetti sulla carne causati da trasporti di 180 e 650 km. In altri studi, al contrario, è stato

come trasporti di soli 15 minuti abbiano provocato stress e acidificazione delle carni maggiori rispetto a trasporti della durata di 3 ore (Perez et al., 2002). Anche la stagione ha influenzato la qualità delle carni: i suini macellati in estate hanno mostrato carni più chiare, meno capaci di trattenere l'acqua durante la cottura e meno dure. Inoltre, anche se in maniera non significativa, il pH a 45' si è rivelato più basso nella stagione estiva. Nonostante il rilievo del drip loss e del pH a 24 ore non evidenzino variazioni, tali carni sembrano avere caratteristiche che le accomunano alle carni PSE. Questo risultato concorda con quanto riportato da Guàrdia et al. (2004), che hanno osservato un rischio circa doppio che le carni suine risultassero PSE durante l'estate rispetto alla stagione fredda. Per quanto riguarda l'analisi dei parametri ematici invece, si è visto come essi non risentano di alcun effetto legato alla stagione, ma siano invece condizionati da altri fattori connessi a trasporto e macellazione. La cortisolemia, com'è logico aspettarsi, è influenzata negativamente da elevate attese pre-macellazione e dall'allungamento della durata del trasporto: nel dettaglio, per ciò che concerne l'attesa pre-macellazione, questo risultato è in parziale contraddizione con la letteratura dato che, di solito, si la cortisolemia tende a normalizzarsi entro 2-3 ore dalla fine del trasporto (Faucitano, 2010). Va ricordato però che shock subiti immediatamente prima della macellazione sono in grado di riportare il cortisolo a livelli elevati (Hambrecht et al., 2002). CK e aldolasi (indicatori di danno muscolare) sono influenzati negativamente dal rimescolamento dei suini e dall'allungamento della durata del trasporto, con differenze significative per trasporti superiori a 160 minuti. Riguardo all'attesa pre-macellazione si osserva un andamento opposto tra cortisolo, che aumenta significativamente nei suini macellati il giorno seguente, e gli indicatori di danno muscolare, che tendono a diminuire significativamente. Il decremento di questi indicatori potrebbe essere imputato al fatto che, per gli animali macellati il giorno dopo, nella quasi totalità dei trasporti sono stati mantenuti i gruppi d'allevamento e quindi le strutture sociali, con conseguente riduzione delle lotte gerarchiche. Per quanto concerne l'aldolasi il dato è conforme a quanto riscontrato da Adenkola e Ayo (2010), i quali hanno rilevato una riduzione di tale parametro 8 ore dopo il trasporto. Analogamente Averos et al. (2007) hanno osservato che il valore di CK tende ad aumentare durante il trasporto, mentre diminuisce durante l'attesa pre-macellazione. Dalle correlazioni tra i punteggi di benessere e i parametri fisiologici e qualitativi si evince che per i parametri di qualità della carne esistono solo poche correlazioni significative, mentre CK e aldolasi risultano sempre connessi significativamente con i punteggi IBA, IBTM e punteggio totale. Suini provenienti da allevamenti con classe IBA 5 o 6 (livello di benessere buono o ottimo) mostrano un aumento significativo dei parametri cortisolo e aldolasi. Tale risultato non stupisce: considerando che il welfare di un organismo è stato definito come il suo stato in relazione ai suoi tentativi di adattarsi all'ambiente (Fraser e Broom, 1997), e che le condizioni di stress derivano da situazioni avverse a cui l'animale fatica ad adattarsi (Broom, 2008), si può intuire come animali abituati ad alti livelli di welfare in allevamento possano essere, di fatto, meno pronti ad adattarsi a situazioni nuove e negative (come il trasporto) e possano quindi reagire con una maggiore risposta in termini di stress (Terulouw, 2005). Tale osservazione concorda con quanto constatato in altre ricerche (si veda ad esempio la review di Edwards, 2005). Va inoltre evidenziato come in alcuni casi (es. azienda C), a fronte di punteggi IBA elevati siano stati rilevati punteggi IBTM bassi: in questi casi particolari l'innalzamento

dei livelli d'indicatori di stress e danno muscolare (valutati sul sangue prelevato alla giugulazione) ha verosimilmente risentito molto delle fasi di trasporto e macellazione. Tutte le aziende hanno ottenuto un punteggio IBTM buono o ottimo (classi 4 e 5), e nello specifico gli animali appartenenti alla classe 5 hanno mostrato un basso livello degli indicatori di danno muscolare con differenze significative per il parametro aldolasi. Premesso che in tutti i trasporti sono stati rispettati gli spazi previsti dalla legislazione (235 kg/m², come stabilito dal Regolamento CE n. 1/2005), una riduzione del numero di animali che durante il carico e lo scarico si scavalcano, scivolano e cadono, migliori caratteristiche della pavimentazione del camion (scivolosità, quantità e qualità della lettiera), nonché un minor impiego di elettrostimolatori, sono fattori che contribuiscono a prevenire danni muscolari responsabili di un aumento dei relativi indicatori ematici. Infine si osserva che il punteggio totale risente fortemente del parametro IBA: le differenze evidenziate sono perciò coerenti con quelle già rilevate per tale punteggio.

CONCLUSIONI

Dalla comparazione effettuata tra i dati relativi alle variabili riferite al benessere animale nelle fasi di allevamento, trasporto e attesa pre-macellazione e le caratteristiche qualitative delle carni ottenute è emerso quanto segue.

Un incremento del livello di benessere dei suini si traduce in un miglioramento di alcune caratteristiche qualitative della carne e, di conseguenza, del reddito di allevatori e macellatori. A tal proposito, confrontando i risultati di questo studio con quelli ottenuti nell'ambito di precedenti ricerche, è stato appurato che il livello di benessere delle aziende da ingrasso è migliorato rispetto al 2009 (Rossi et al., 2009): ciò è dimostrato dal fatto che il 63% delle aziende coinvolte nel progetto si sia collocato nelle classi IBA migliori, il 37% in quelle centrali, mentre nessuna azienda è rientrata nelle classi peggiori.

In riferimento alle caratteristiche qualitative delle carni, esse appaiono maggiormente influenzate dal benessere durante le fasi di trasporto e macellazione più che da quello in allevamento. Nello specifico il colore delle carni appare il parametro più inficiato, alterato soprattutto da trasporti di lunga durata, commistione di suini provenienti da gruppi d'allevamento diversi e lunghe attese pre-macellazione. L'allungamento dei tempi di trasporto è inoltre responsabile anche di una riduzione del pH a 24 ore, che tende a conferire alle carni un aspetto più lucido e bagnato.

Per ciò che concerne i parametri fisiologici essi risultano influenzati sia dalla classe IBA che dalla classe IBTM, specialmente cortisolo e aldolasi. Tuttavia, per gli effetti della classe IBA, è difficile escludere l'influenza di trasporto e macellazione in quanto tali fasi sono in grado di causare un innalzamento cospicuo degli indicatori fisiologici rilevabile nel sangue prelevato al momento della giugulazione.

In ultima analisi poi, tra i parametri legati a trasporto e macellazione, l'allungamento della durata del trasporto e il rimescolamento degli animali all'uscita dell'allevamento sono quelli che sono risultati maggiormente influenzanti sia gli indicatori fisiologici che le caratteristiche qualitative della carne.

RINGRAZIAMENTI

Ricerca finanziata dalla Regione Emilia-Romagna – Misura 124 del Programma di Sviluppo Rurale 2007-2013. Titolo del progetto «Benessere dei suini nelle fasi di trasporto e macellazione e qualità percepita della carne». Si ringrazia il macello Italcarni, e tutte le aziende agricole coinvolte.

BIBLIOGRAFIA

- Adenkola A.Y., Ayo J.O., (2010) "Physiological and behavioural responses of livestock to road transportation stress: A review". *Afr. J. of Biotechnol.* 9, 4845-4856.
- Averós X., Herranz A., Sanchez R., Comella J.X., Gosálvez L.F., (2007) "Serum stress parameters in pigs transported to slaughter under commercial conditions in different seasons". *Veterinarni Medicina* 52, 333-342.
- Barbari M., Gastaldo A., Rossi P. (2008) "Farm Welfare Index for assessment of wellbeing in swine farms" in: International Conference "Innovation Technology to Empower Safety, Health and Welfare in Agriculture and Agro-food Systems", Ragusa, 15-17 september 2008.
- Brant P., Aaslyng M.D., Rousing T., Schild S.L.Aa., Herskin M.S., (2015) "The relationship between selected physiological post-mortem measures and an overall pig welfare assessment from farm to slaughter". *Livest. Sci.* 180, 194-202.
- Broom D.M. (2008) "Welfare concepts" in: Faucitano L., Schaefer A.L. "Welfare of pigs from birth to slaughter", 1a ed., Versailles, Wageningen Academic Publishers – The Netherlands & Éditions Quæ, 15-32.
- D.M. (2014) "Welfare of Transported Animals: Factors Influencing Welfare and Welfare Assessment" in: Grandin T. "Livestock Handling and Transport", 4a ed., Wallingford, CABI, 23-38.
- Debenedetti A. (2008) "Endocrinologia" in: Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. "Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia", 2° ed., Torino, UTET, 723-735.
- Edwards S.A., (2005) "Product quality attributes associated with outdoor pig production". *Livest. Prod. Sci.* 9, 5-14.
- Faucitano L., (2010) "Invited review: Effects of lairage and slaughter conditions on animal welfare and pork quality". *Can. J. Anim. Sci.* 90, 461-469.
- Fraser A.F., Broom D.M. (1997) "Farm Animal Behaviour and Welfare", 3a ed., Wallingford, CABI Publishing, 437.
- Gastaldo A., Rossi A., Bortolazzo E., Borciani M., Bertolini A., Gorlani E., (2013) "Il benessere degli animali e la qualità delle carni". *Suinicoltura* 11, 28-31.
- Gregory N.G. (1998) "Animal Welfare and Meat Science", 1a ed., Wallingford, CABI Publishing, 298.
- Guàrdia M.D., Estany J., Balasch S., Oliver M.A., Gispert M., Diestre A., (2004) "Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs". *Meat Sci.* 67, 471-478.
- Hambrecht E., Eissen J.J., Nooijen R.I.J., Ducro B.J., Smits C.H.M., Den Hartog L.A., Verstegen M.W.A., (2002) "Preslaughter stress and muscle energy largely determine pork quality at two commercial processing plants". *J. Anim. Sci.* 82, 1401-1409.
- Hoffmann W.E., Solter P.F. (2008) "Diagnostic enzymology of domestic animals" in: Kaneko J.J. "Clinical biochemistry of domestic animals", 6a ed., San Diego, Academic Press, 351-378.
- Knowles T.G., Warriss P.D. (2014) "Stress physiology of animals during transport" in: Grandin T. "Livestock Handling and Transport", 4a ed., Wallingford, CABI, 399-420.
- Martoccia L., Brambilla G., Macri A., Moccia G., Cosentino E., (1995) "The effect of transport on some metabolic parameters and meat quality in pigs". *Meat Sci.* 40, 271-277.
- Mench J.A. (2004) "Management, handling, and transport of farm animals" in: "Global conference on animal welfare: an OIE initiative, Paris, 23-25 february 2004" Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities, 149-155.
- Pecorino B. (2009) "Le filiere agroalimentari in rapporto alle esigenze di rintracciabilità" in: D'Amico M. e Lanfranchi M. "Produzioni agroalimentari tra rintracciabilità e sicurezza – Analisi economiche e politiche d'intervento. Atti del XLIV convegno di studi, Taormina, 8-10 novembre 2007", Milano, Franco Angeli Editore, 119-156.
- Pérez M.P., Palacio J., Santolaria M.P., Aceña M.C., Chacón G., Gascón M., Calvo J.H., Zaragoza P., Beltran J.A., García-Belenguer S., (2002) "Effect of transport time on welfare and meat quality in pigs". *Meat Sci.* 6, 425-433.
- Rossi P., Gastaldo A., Borciani M., (2009) "Un metodo innovativo per valutare il benessere animale negli allevamenti". *Suinicoltura* 12, 67-73.
- StatSoft, Inc. (2011). *Electronic Statistics Textbook*. Tulsa, OK: StatSoft.
WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/>.
- Tamanini C., Giordano N., Chiesa F., Seren E., (1983) "Plasma cortisol variations induced in the stallion by mating". *Acta Endocrinol.* 102, 447-450.
- Terlouw C., (2005) "Stress reactions at slaughter and meat quality in pigs: genetic background and prior experience. A brief review of recent findings". *Livest. Prod. Sci.* 94, 125-135.

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2017

EPIDEMIOLOGIA E GENOTIPI DI *TOXOPLASMA GONDII* NEL CINGHIALE E IN SUINI DA ALLEVAMENTI CONVENZIONALI

EPIDEMIOLOGY AND GENOTYPES OF TOXOPLASMA GONDII IN WILD BOARS AND IN PIGS RAISED IN INTENSIVE FARMS

VILLA L., GAZZONIS A. L., MANFREDI M. T.

Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET), Università degli Studi di Milano

Parole chiave: *Toxoplasma gondii*, suini, cinghiali

Key words: *Toxoplasma gondii*, pigs, wild boars

Riassunto

Per la possibile presenza di cisti tissutali, le carni di suini e cinghiali rappresentano una importante fonte di infezione da *Toxoplasma gondii* per l'uomo. Lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'epidemiologia e i genotipi di *T. gondii* in suini e cinghiali in Nord Italia. Preliminarmente è stato eseguito uno screening sierologico (ELISA) per rilevare la circolazione dell'infezione; successivamente, sono state eseguite indagini di biologia molecolare (PCR) per valutare l'effettiva infettività delle carni e per determinare i genotipi del parassita circolanti. Sono stati raccolti campioni di sangue e di muscolo di 340 suini (189 suini all'ingrasso e 151 scrofe riproduttrici) provenienti da 23 allevamenti convenzionali della Pianura Padana e di 75 cinghiali sottoposti a prelievo venatorio nella Provincia del Verbano-Cusio-Ossola. Sono risultati positivi al test sierologico 14 suini (4,1%) con una prevalenza maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto ai suini all'ingrasso (0,5%). Le analisi molecolari hanno consentito di individuare in 8 soggetti i genotipi I, II e III del parassita. Tra i diversi allevamenti o anche all'interno dello stesso allevamento sono risultati circolare genotipi diversi. Relativamente ai cinghiali, 25 animali sono risultati positivi al test ELISA (33,8%) e di questi 3 anche in PCR, rilevandosi la circolazione del ceppo di tipo II. I risultati del presente studio confermano la circolazione di diversi genotipi di *T. gondii* in queste specie di suidi nel Nord Italia, con prevalenze maggiori nei cinghiali cacciati rispetto ai suini da allevamenti intensivi, e avvalorano l'importanza di monitorare e sorvegliare tale parassitosi dagli importanti risvolti zoonosici.

Abstract

Due to the possible presence of tissue cysts, meat from pigs and wild boars represent an important source of *Toxoplasma gondii* infection for humans. The aim of the study was to evaluate the epidemiology and genotypes of *Toxoplasma gondii* in pigs and wild boars in Northern Italy. Preliminarily, a serological screening (ELISA) was performed to evaluate the rate of infection; then, molecular biology techniques (PCR) were used to evaluate the actual infectivity of the meat and to determinate the genotypes of circulating parasites. Blood and muscle samples from 340 pigs (189 market pigs and 151 sows) raised in 23 intensive farms in the Pianura Padana, and from 75 wild boars hunted in the Provincia of Verbano-Cusio-Ossola, were collected. 14 pigs were found positive to the serological test (4,1%), the seroprevalence was higher in sows (8,6%) than in market pigs (0,5%). Molecular biology assays permitted to identify in 8 animals genotypes I, II and III of the parasite. Between different farms or also in the same farm, genotypes varied. For what concerns wild boars, 25 animals were found positive to ELISA (33,8%) and 3 of these also to PCR, noting the circulation of genotype II. The results of this study confirmed the presence of different *T. gondii* genotypes in these

species of Suidae in Northern Italy, with higher prevalences in wild boars than in pigs, and support the importance of monitoring and surveillance of this parasitosis with important zoonotic implications.

INTRODUZIONE

Toxoplasma gondii è un protozoo parassita ubiquitario appartenente al phylum Apicomplexa, in grado di infettare un ampio range di ospiti e di cellule diverse [1]. Il gatto domestico e i felini selvatici sono gli ospiti definitivi di *Toxoplasma gondii*, mentre gli ospiti intermedi sono quasi tutte le specie di mammiferi e uccelli, compreso l'uomo.

L'uomo può infettarsi in diversi modi: mangiando carni crude o poco cotte di ospiti intermedi contenenti cisti tissutali, alimenti di origine vegetale contaminati da oocisti sporulate o ingerendo accidentalmente questi stadi, tramite trasfusione di sangue o trapianto d'organo e per via transplacentare da madre a feto.

I suini e gli ovicapri tra le specie domestiche e, tra gli animali selvatici, i cinghiali e i cervi, rappresentano le specie in cui si rileva una maggiore frequenza di cisti tissutali, e da qui l'importanza delle loro carni come fonte di infezione per l'uomo [2].

La toxoplasmosi è una delle più comuni malattie zoonotiche di origine parassitaria a livello mondiale e la più comune nell'Unione Europea [3]. Con un approccio basato su diversi criteri, la FAO e il WHO hanno incluso *Toxoplasma gondii* nella 'top ten' dei parassiti di origine alimentare più dannosi al mondo [4]. A livello europeo, l'EFSA riporta che nonostante la toxoplasmosi presenti la più alta incidenza umana tra le zoonosi parassitarie, nell'Unione Europea questa sia considerata una malattia sotto rilevata e sotto riportata. Infatti, benché gli Stati membri abbiano l'obbligo di riportare dati riguardanti la situazione epidemiologica per *Toxoplasma* (Direttiva 2003/99/CE), non sono disponibili dati rappresentativi né per gli esseri umani, né per gli animali e né per gli alimenti [5].

In diversi studi è stata evidenziata l'importanza dei genotipi di *Toxoplasma gondii* nel determinare la gravità della malattia nell'uomo. In particolare, i ceppi di tipo II, sono stati identificati come la causa di più del 70% dei casi umani di toxoplasmosi negli Stati Uniti e in Europa; invece, i ceppi di tipo I e quelli ricombinanti o atipici sono stati associati ad una più alta incidenza di toxoplasmosi oculare e di toxoplasmosi grave anche nei pazienti immunocompetenti [6, 7, 8, 9].

SCOPO DEL LAVORO

Ad oggi mancano dati epidemiologici rappresentativi e aggiornati riguardanti la prevalenza di *Toxoplasma gondii* nei suidi del Nord Italia. Pertanto, vista l'importanza delle carni di suini e cinghiali come fonte di infezione per l'uomo, il presente studio si è proposto di valutare l'epidemiologia di *Toxoplasma gondii* in suini da allevamenti convenzionali e in cinghiali sottoposti a prelievo venatorio nel Nord Italia, attraverso uno screening sierologico per valutare la circolazione dell'infezione, e la successiva analisi molecolare per valutare l'effettiva infettività delle carni e per determinare i genotipi del parassita circolanti tra le popolazioni di animali oggetto di studio.

MATERIALI E METODI

Descrizione dell'area

La suinicoltura italiana è concentrata nel Nord Italia: in particolare, la Lombardia è la regione italiana che alleva il maggior numero di suini e gli allevamenti suinicoli intensivi sono concentrati soprattutto nelle aree di pianura, mentre nelle aree collinari e montane la produzione suinicola è solo marginale. Quasi tutti gli allevamenti campionati appartengono alla cosiddetta Bassa Padana e in particolare alle province di Pavia, Lodi, Cremona, Mantova,

Milano e Brescia, una zona caratterizzata da un clima tipicamente continentale e da una forte umidità. Sono stati campionati anche un allevamento della provincia emiliana di Piacenza sui Colli Piacentini e un allevamento della Bassa Comasca, una zona della provincia di Como nell'Alta Pianura lombarda, entrambe zone caratterizzate comunque da un clima pressoché simile a quello della Pianura Padana.

I cinghiali campionati provengono dalla provincia del Verbano-Cusio-Ossola, situata nel Nord della regione Piemonte; in particolare, i cinghiali sono stati cacciati nei comuni di Verbania e dintorni, un territorio quasi interamente collinare e montuoso, con un clima variabile, da alpino a temperato, a seconda dell'altitudine della zona considerata, caratterizzato da inverni freddi, estati calde e forte piovosità.

Campionamento

Il campionamento dei suini è stato condotto da novembre 2015 a novembre 2016. Sono stati campionati complessivamente 340 suini (189 suini all'ingrasso e 151 scrofe riproduttrici) provenienti da 23 allevamenti convenzionali siti in Lombardia (Pianura Padana); per ogni azienda sono stati campionati in media 16 animali (min-max: 10-30). Per i suini campionati sono stati raccolti dati epidemiologici circa il management dell'allevamento. Durante la macellazione sono stati raccolti campioni di coagulo e di tessuto muscolare cardiaco, da cui sono stati ottenuti il siero per centrifugazione (4000 r.p.m., 5 minuti) e l'omogenato di tessuto miocardico (circa 50 grammi), in seguito stoccati a -20°C in attesa di analisi.

Il campionamento dei cinghiali è stato condotto nella stagione di caccia, indicativamente da ottobre a dicembre, nel corso di 2 anni consecutivi (2015 e 2016). Sono stati campionati 75 cinghiali (54 nel 2015 e 21 nel 2016) sottoposti a prelievo venatorio in Piemonte (Provincia del Verbano-Cusio-Ossola). Si precisa che il campionamento per la stagione 2016 è ancora in corso. I dati epidemiologici raccolti per i cinghiali sono l'età, il sesso, il peso e il luogo di abbattimento dell'animale. In questo caso, vista l'impossibilità di raccogliere campioni di sangue, sono stati raccolti soltanto campioni di tessuto muscolare diaframmatico, da cui sono stati ottenuti il succo di carne (meat juice) secondo la tecnica descritta da Nöckler et al. [10] e l'omogenato di tessuto muscolare, stoccati congelati a -20°C in attesa di analisi.

Sierologia

I campioni di siero dei suini e quelli di succo carneo dei cinghiali sono stati analizzati con ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species (IDvet), un kit diagnostico ELISA indiretto progettato per la ricerca di anticorpi specifici di *Toxoplasma gondii* in siero, plasma o estratto di carne di ruminanti, cani, gatti e suini. Il test è stato eseguito seguendo la procedura indicata nelle istruzioni fornite dal produttore.

Analisi statistica

La prevalenza di infezione nel suino e nelle diverse categorie produttive considerate è stata calcolata secondo Bush et al. [11]. In analogia, la prevalenza di infezione è stata calcolata nel cinghiale e nelle diverse categorie considerate (classi di età, genere, anno di campionamento). Sui dati ottenuti nel cinghiale è stata condotta l'analisi dei fattori di rischio associati all'infezione da *T. gondii*. Un modello lineare generalizzato (GLM) è stato condotto utilizzando il logaritmo naturale dei valori SP% ELISA come variabile dipendente; le seguenti variabili risposta sono state introdotte nel modello completo: età (variabile ordinale: rosso, subadulto, adulto1, adulto2, adulto3, adulto4), genere (variabile categoria), peso (variabile continua). L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS.

Biologia molecolare

I suini e i cinghiali risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* nel siero

o nel meat juice sono stati sottoposti ad analisi molecolare. Campioni di omogenato di tessuto muscolare cardiaco (suini) o diaframmatico (cinghiali) sono stati processati per l'estrazione del DNA genomico utilizzando il kit commerciale NucleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel). I campioni di DNA ottenuti sono stati analizzati mediante PCR nested secondo il protocollo descritto da Hurtado et al. [12] per il rilevamento di DNA di *Toxoplasma gondii*. Successivamente, sui campioni risultati positivi, è stata effettuata la genotipizzazione mediante PCR multilocus come descritto da Su et al. [13] e sequenziamento (Metabion, Martinsried, Germany).

Le sequenze ottenute sono state manualmente corrette e successivamente confrontate con sequenze note dei diversi genotipi di *T. gondii* depositate in GenBank utilizzando il programma Mega6 [14].

RISULTATI

Nei suini è stata rilevata una sieroprevalenza di 4,1% (14/340), registrandosi una prevalenza maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto agli ingrassi (0,5%). Le scrofe positive al test ELISA mostravano un valore S/P% medio di 91,59 (min 50,08-max 178,97); queste scrofe provenivano da 7 allevamenti delle province di Lodi, Pavia, Brescia e Sud di Milano. Il suino all'ingrasso positivo al test anticorpale presentava un valore S/P% pari a 174,5%; questo campione proveniva da un allevamento del Lodigiano, dal quale tra l'altro provenivano anche 3 delle scrofe positive (Figura 1). Delle 12 scrofe provenienti da 7 allevamenti analizzate, 8 provenienti da 5 allevamenti sono risultate positive alla PCR; non è stato possibile analizzare una scrofa in quanto di questa non si aveva a disposizione il tessuto muscolare cardiaco. Il suino all'ingrasso positivo al test sierologico è risultato positivo anche alla PCR; questo animale proveniva dallo stesso allevamento nel quale sono state trovate 3 scrofe positive al test ELISA, delle quali 2 positive anche in PCR. Per quanto riguarda la genotipizzazione delle ~~in tre~~ animali è stato identificato il genotipo I, in altrettante tre il genotipo II e nelle altre due il genotipo III. In tre allevamenti è stato riscontrato un solo genotipo circolante, mentre è stato evidenziato come in due allevamenti circolassero due genotipi diversi del parassita (genotipi I e II in un allevamento e genotipi II e III nell'altro). La genotipizzazione del suino all'ingrasso positivo in PCR è in corso.

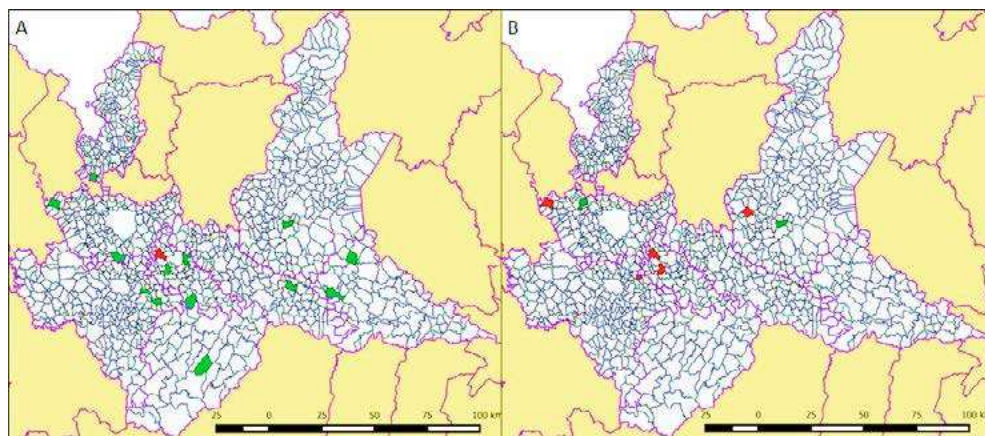


Figura 1. Distribuzione spaziale degli allevamenti di suini all'ingrasso (A) e di scrofe (B) campionati. In grigio scuro sono indicati i positivi, in grigio chiaro i negativi.

Figure 1. Map of location of sampled market pigs (A) and sows (B) farms. Positive farms are marked in dark grey, negative farms in light grey.

Nei cinghiali è stata rilevata una sieroprevalenza pari a 33,8% (25/74) e 4 campioni sono risultati dubbi in quanto aventi valore S/P% compreso tra 40 e 50%. Non è stato possibile analizzare un campione dei 54 raccolti nel 2015 in quanto il meat juice non era sufficiente. I campioni positivi in sierologia mostravano un valore S/P% medio pari a 99,24 (min 59-max 145); questi animali, così come quelli risultati dubbi, provenivano da 12 dei 14 comuni della provincia del Verbano-Cusio-Ossola dove sono stati abbattuti i cinghiali campionati (Figura 2). È stata rilevata una sieroprevalenza più alta nei cinghiali campionati nel 2015 (43,4%) rispetto a quelli del 2016 (9,5%); occorre tuttavia considerare che i dati del 2016 sono parziali essendo il campionamento ancora in corso. Per quanto riguarda i dati epidemiologici raccolti, è stata evidenziata una prevalenza maggiore negli animali giovani (40%) rispetto agli animali adulti (29,2%) e più alti valori di SP% in ELISA; considerando il sesso, la prevalenza di infezione negli esemplari femmine e in quelli maschi mostravano valori molto simili (P=33.3% e 34%, rispettivamente). L'analisi statistica mediante GLM non ha evidenziato alcuna associazione tra l'infezione e i fattori di rischio considerati, risultando tutte le variabili introdotte nel modello (età, sesso e peso) statisticamente non significative. Dei 25 cinghiali sieropositivi, 2 sono risultati positivi anche in PCR: i due esemplari provenivano dallo stesso comune, erano entrambi di sesso maschile, uno rosso e l'altro adulto 2, di 19 e 42 kg di peso, rispettivamente; in questi animali è stata dimostrata la circolazione del genotipo II. Anche uno dei cinghiali risultati dubbi al test ELISA è stato confermato positivo in PCR: si trattava di un esemplare adulto 2 maschio, di 45 kg di peso; per questo campione la determinazione del genotipo è in corso.

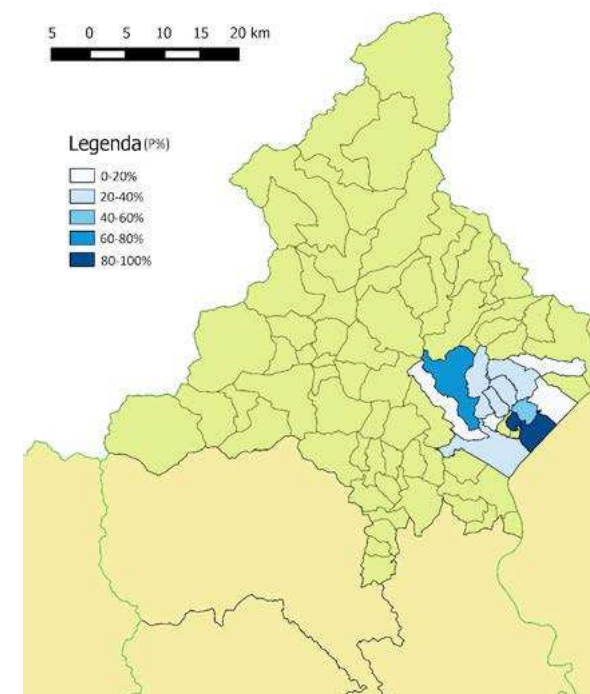


Figura 2. Distribuzione spaziale dei comuni della Provincia del Verbano-Cusio-Ossola nei quali è stato effettuato il prelievo venatorio dei cinghiali; a diversi colori corrisponde un diverso livello di sieroprevalenza.

Figure 2. Map of location of sampled districts of the Provincia of Verbano-Cusio-Ossola where wild boars were hunted; to different colours corresponds a different level of seroprevalence.

DISCUSSIONE

È stato dimostrato in diversi studi come in Europa il consumo di carne cruda o poco cotta infetta sia una delle principali vie di infezione da *Toxoplasma* nell'uomo [15, 16, 17]. L'EFSA, nell'opinione scientifica riguardante i pericoli per la salute pubblica da prendere in considerazione nell'ispezione sanitaria delle carni [18], ha incluso *Toxoplasma gondii* tra i patogeni zoonotici derivanti dal consumo di carne di suino, evidenziando inoltre l'importanza di sistemi di monitoraggio sierologici per diagnosticare le zoonosi subcliniche negli animali macellati, che non sono rilevabili con i metodi di ispezione tradizionali. Recentemente, sempre l'EFSA, ha pubblicato delle specificazioni tecniche riguardanti indicatori epidemiologici armonizzati per i pericoli biologici da considerare in sede di ispezione sanitaria delle carni di animali selvatici allevati [19], includendo anche *Toxoplasma gondii* nel cinghiale.

Per la valutazione della circolazione e la sorveglianza dell'infezione, le indagini sierologiche per *Toxoplasma gondii* negli animali domestici e selvatici rappresentano un importante mezzo diagnostico, considerando la persistenza a lungo termine di anticorpi specifici e la forte associazione tra sieropositività e infettività delle carni derivate [20]. Numerosi test sono stati messi a punti per la diagnosi sierologica dell'infezione da *T. gondii*. Per il presente lavoro è stato utilizzato un kit ELISA commerciale (ID Screen® Toxoplasmosis Indirect Multi-species, IDVET) sia per i suini che per i cinghiali, rispettivamente su siero e succo carneo. Questo ELISA ha mostrato ottime sensibilità (90%) e specificità (97,39%) ed una concordanza con IFA dell'87% nella determinazione di anticorpi anti-*Toxoplasma gondii* nei sieri di suino; inoltre, all'esame dei campioni di succo carneo, è stata osservata una concordanza sostanziale con i risultati ottenuti all'analisi del siero [21]. In particolare, il succo carneo è stato proposto come valida matrice alternativa per la ricerca di anticorpi di *Toxoplasma gondii* negli animali selvatici inclusi i cinghiali, in quanto nell'ambito dei prelievi venatori non è sempre possibile il campionamento ematico ante-mortem e vi sono ovvie difficoltà logistiche nell'ottenere campioni di siero anche dopo la morte dell'animale [22]. I tessuti muscolari più frequentemente utilizzati per ottenere il succo di carne sono i muscoli cardiaco e diaframmatico. Nel presente studio, il succo carneo usato per le indagini sierologiche dei cinghiali è stato ottenuto a partire da campioni di muscolo diaframmatico, che risulta essere uno dei muscoli più idonei per ottenere questo substrato per la ricerca di *Toxoplasma gondii* [23].

La sieroprevalenza riscontrata nei suini (4,1%) è in linea con altri studi europei [24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31], ma risulta più bassa di quella riportati in studi italiani recenti condotti in Centro Italia e nelle Isole Maggiori (Sicilia e Sardegna) (10-16%) [32, 33, 34]. La sieroprevalenza è risultata maggiore nelle scrofe (8,6%) rispetto ai suini all'ingrasso (0,5%), riscontro comune anche ad altri lavori [24, 27, 29, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40], nei quali è stato dimostrato come l'età rappresenti un importante fattore di rischio per l'infezione da *Toxoplasma gondii*: gli animali riproduttori, vivendo più a lungo, hanno maggiori possibilità di entrare a contatto con il parassita, oltre al fatto che l'immunità persiste per tutta la vita dell'animale.

Si è assistito ad una significativa riduzione della prevalenza di *Toxoplasma gondii* nei suini negli ultimi 20 anni: l'unico studio presente in letteratura condotto nel Nord Italia riporta una prevalenza del 64,4% [41]. Si sottolinea quindi l'importanza del management di allevamento e in particolare delle misure di biosicurezza per il controllo del parassita nei suini, soprattutto in relazione al confinamento degli animali, al controllo di gatti e roditori, così come di altri micromammiferi che possono veicolare *Toxoplasma*, e al controllo dell'acqua e degli alimenti a disposizione degli animali. Negli ultimi anni, vista la sempre maggiore sensibilità dei consumatori per tematiche di benessere animali, stanno assumendo sempre più importanza e diffusione le tipologie di allevamento cosiddette 'animal friendly'

e in particolare l'allevamento biologico e all'aperto. Diversi studi, condotti soprattutto in Olanda ma anche in altri Paesi europei, hanno evidenziato come queste tipologie di allevamento siano un importante fattore di rischio per la riemersione della parassitosi [25, 26, 42, 43].

La prevalenza dell'infezione riscontrata a livello sierologico si riflette nel grado di infettività delle carni. Infatti, dei 14 campioni risultati sieropositivi solo 10 sono stati confermati positivi all'analisi molecolare. Anche in altri studi è stato riportato un andamento simile [44, 45, 46, 47, 48]. La negatività della PCR in animali positivi al test sierologico può essere dovuta alla sensibilità della tecnica molecolare, alla limitata dimensione del campione, alla distribuzione irregolare delle cisti tissutali nella muscolatura, diversa inoltre nei vari organi e tessuti, e forse anche al basso numero di cisti tissutali nei tessuti dei suini testati [49]. Per le analisi di biologia molecolare è stato utilizzato l'omogenato di tessuto muscolare cardiaco dei suini campionati, in quanto il tessuto miocardico rappresenta uno dei siti di elezione dove riscontrare le cisti tissutali del parassita in questa specie ospite, come dimostrato in suini infettati sperimentalmente [50].

Successivamente, per la corretta valutazione del rischio rappresentato per l'uomo dal consumo di prodotti di origine animali, di fondamentale importanza è la determinazione del genotipo: infatti, a diversi genotipi descritti sono state attribuite diverse forme cliniche [20]. Ad oggi, vi sono solo pochi studi riguardanti i genotipi di *Toxoplasma gondii* attualmente circolanti in Italia negli animali domestici. In particolare, Bacci et al. [47] hanno evidenziato una predominanza dei pattern di Tipo II o di Tipo I/II in suini allevati in Nord Italia. Nel presente lavoro sono stati riscontrati tutti i 3 genotipi di *Toxoplasma gondii*, ovvero i Tipi I, II e III, variabili anche all'interno dello stesso allevamento. La forte diversità genotipica del parassita potrebbe portare a eventi di ricombinazione genetica, che potrebbero potenzialmente generare più ceppi con nuove proprietà biologiche, come una maggiore virulenza per l'uomo [54].

La sieroprevalenza riscontrata nei cinghiali (33,8%) è in linea con altri studi europei [28, 55, 56, 57, 58, 59, 60] e risulta leggermente più alta di quella riscontrata finora in Italia (14-18%) [32, 61, 62, 63]. È stata rilevata una prevalenza maggiore negli animali giovani (40%) rispetto agli adulti (29,2%). Ad oggi non è ancora chiaro se l'età sia o meno un fattore di rischio per la parassitosi nel cinghiale: vi sono infatti studi che hanno evidenziato una maggiore prevalenza nei giovani [64] e, al contrario, altri studi hanno riportato una prevalenza maggiore negli adulti, analogamente anche a quanto ormai assodato nel suino [60, 65, 66, 67, 68, 69], mentre in altri lavori non sono state rilevate differenze significative [58, 70, 71, 72, 73]; ad ogni modo per trarre conclusioni certe in merito alla persistenza dell'immunità per tutta la vita dell'animale sono necessari ulteriori studi [57]. Ancora, in questo lavoro, in accordo con altri studi [58, 71, 74], non è stata evidenziata una correlazione tra la sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* e il sesso dei cinghiali; vi sono altresì alcuni studi in cui il sesso femminile è risultato essere un fattore di rischio per la parassitosi [60, 72], mentre in un solo caso il sesso maschile è stato associato ad una maggiore prevalenza del parassita [66]. Inoltre, è stata evidenziata una prevalenza della parassitosi ben più alta nei campioni di cinghiali abbattuti nella stagione di caccia dell'anno 2015 rispetto all'anno 2016, rispettivamente pari a 43,4% e 9,5%. Le cause di tale discrepanza potrebbero essere legate ad una diminuzione della popolazione di cinghiali nella zona campionata a causa di un eccessivo abbattimento di animali e quindi una minore densità di popolazione, ma anche al cambiamento delle abitudini alimentari degli animali in base alle fonti di cibo disponibili, legate anche alla presenza di altre specie selvatiche; da considerare anche le condizioni climatiche, potenzialmente variabili tra un inverno e l'altro, che possono influenzare la sopravvivenza delle oocisti parassitarie in ambiente. Si tratta comunque di ipotesi aperte e ad oggi non è possibile trarre conclusioni certe a riguardo, in quanto il

campionamento per la stagione di caccia del 2016 è ancora in corso.

I cinghiali giocano un ruolo importante nel mantenere il ciclo selvatico del parassita (cinghiali – volpi – roditori – cinghiali), favorito anche dalle cattive pratiche dei cacciatori, che lasciano residui di carcasse di cinghiali nell'ambiente a disposizione di altri animali selvatici. Per questi motivi, i cinghiali sembrano essere indicatori ideali per capire le [geografiche] associate alla prevalenza della parassitosi in ambito selvatico [61].

Inoltre, vista la sempre maggiore probabilità di condividere lo stesso ambiente, l'infezione protozoaria negli animali selvatici potrebbe rappresentare un indicatore epidemiologico per il rischio di trasmissione agli animali domestici [2]. Pertanto, le informazioni sulla prevalenza della parassitosi nella fauna selvatica sono utili per valutare la contaminazione ambientale di *Toxoplasma* e il rischio associato per la salute pubblica [75].

La presenza di cisti tissutali di *T. gondii* è stata confermata nel presente studio in due animali, andamento simile anche ad altri lavori [44, 64, 76]. Le analisi di biologia molecolare sono state condotte sui campioni di tessuto diaframmatico dei cinghiali sottoposti a prelievo venatorio, essendo dimostrato come il diaframma rappresenti uno dei tessuti di elezione delle cisti tissutali parassitarie nei suidi [50]. Il genotipo riscontrato in questa specie è soltanto il II; tuttavia, come precedentemente evidenziato, il campionamento di questa specie è ancora in corso. La caratterizzazione del genotipo è particolarmente importante dato che, come suggerito da Grigg e Sundar [54], la ampia diversità di ceppi di *Toxoplasma gondii* infettanti varie prede nel ciclo selvatico può produrre nuovi ceppi in grado di espandersi clonalmente e quindi estendersi anche al ciclo domestico.

CONCLUSIONI

I dati ottenuti confermano l'importanza delle carni infette come fonte di infezione da *Toxoplasma gondii* per l'uomo e la necessità di piani di monitoraggio e sorveglianza per le specie domestiche e selvatiche destinate al consumo umano, in particolare suini, cinghiali, ovicapri e cervi, che sono le specie animali in cui è stata dimostrata una maggiore frequenza di cisti tissutali nelle carni. Alcuni Autori hanno proposto la sierologia su succo carneo come mezzo di controllo per alcuni patogeni tra cui *Toxoplasma gondii*, in quanto in questo modo sarebbe possibile creare profili sierologici di allevamento ed andare ad implementare le misure di biosicurezza in allevamenti problematici [77, 78]; inoltre, *Toxoplasma gondii* potrebbe essere un valido strumento come marker di biosicurezza e di standard igienici dell'allevamento suinicolo.

Oltre al monitoraggio sierologico, si sottolinea ancora una volta l'importanza della biologia molecolare e soprattutto della genotipizzazione: in particolare, con la PCR multilocus a più geni è possibile valutare la possibile presenza di ricombinazioni genetiche del parassita e quindi lo sviluppo di ceppi ricombinanti e atipici, soprattutto in relazione agli animali selvatici, nei quali questi eventi potrebbero avvenire con più facilità, il che rappresenta a sua volta un rischio non trascurabile anche per gli animali allevati e quindi per l'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Dubey JP. Toxoplasmosis of Animals and Humans. 2nd edn. Boca Raton, FL; 2010.
2. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. Int J Parasitol. 2000;30 12-13:1217-58.
3. ECDC/EFSA: The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. EFSA Journal. 2014.
4. FAO/WHO: Multicriteria-based ranking for risk management of food-borne parasites. vol. Microbiological Risk Assessment Series. Rome. 2014.

5. EFSA: Scientific Opinion on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. vol. EFSA Journal. 2007.
6. Ajzenberg D, Cogné N, Paris L, Bessières MH, Thulliez P, Filisetti D, et al. Genotype of 86 *Toxoplasma gondii* isolates associated with human congenital toxoplasmosis, and correlation with clinical findings. J Infect Dis. 2002;186 5:684-9.
7. Carme B, Bissuel F, Ajzenberg D, Bouyne R, Aznar C, Demar M, et al. Severe acquired toxoplasmosis in immunocompetent adult patients in French Guiana. J Clin Microbiol. 2002;40 11:4037-44.
8. Howe DK, Sibley LD. *Toxoplasma gondii* comprises three clonal lineages: correlation of parasite genotype with human disease. J Infect Dis. 1995;172 6:1561-6.
9. Grigg ME, Ganatra J, Boothroyd JC, Margolis TP. Unusual abundance of atypical strains associated with human ocular toxoplasmosis. J Infect Dis. 2001;184 5:633-9.
10. Nöckler K, Serrano FJ, Boireau P, Kapel CM, Pozio E. Experimental studies in pigs on *Trichinella* detection in different diagnostic matrices. Vet Parasitol. 2005;132 1-2:85-90.
11. Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. J Parasitol. 1997;83 4:575-83.
12. Hurtado A, Aduriz G, Moreno B, Barandika J, García-Pérez AL. Single tube nested PCR for the detection of *Toxoplasma gondii* in fetal tissues from naturally aborted ewes. Vet Parasitol. 2001;102 1-2:17-27.
13. Su C, Shwab EK, Zhou P, Zhu XQ, Dubey JP. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. Parasitology. 2010;137 1:1-11.
14. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30 12:2725-9.
15. Baril L, Ancelle T, Goulet V, Thulliez P, Tirard-Fleury V, Carme B. Risk factors for *Toxoplasma* infection in pregnancy: a case-control study in France. Scand J Infect Dis. 1999;31 3:305-9.
16. Cook AJ, Gilbert RE, Buffolano W, Zufferey J, Petersen E, Jenum PA, et al. Sources of *Toxoplasma* infection in pregnant women: European multicentre case-control study. European Research Network on Congenital Toxoplasmosis. BMJ. 2000;321 7254:142-7.
17. Kapperud G, Jenum PA, Stray-Pedersen B, Melby KK, Eskild A, Eng J. Risk factors for *Toxoplasma gondii* infection in pregnancy. Results of a prospective case-control study in Norway. Am J Epidemiol. 1996;144 4:405-12.
18. EFSA: Scientific opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from swine. vol. EFSA Journal. 2011.
19. EFSA: Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from farmed game. vol. EFSA Journal. 2013.
20. Dubey JP. Toxoplasmosis in pigs--the last 20 years. Vet Parasitol. 2009;164 2-4:89-103.
21. Veronesi F, Ranucci D, Papa P, Branciarri R, Miraglia D, Moretta I, et al. Comparison between a commercial ELISA and IFAT for the detection of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies on serum and meat juice of swine. Large Animal Review. 2012;18:65-70.
22. Coelho C, Lopes AP, Mesquita JR, Cardoso L, Vieira-Pinto M. *Toxoplasma gondii* Infection in Hunted Wild Boars (*Sus scrofa*): Heart Meat Juice as an Alternative Sample to Serum for the Detection of Antibodies. Ecohealth. 2015;12 4:685-8.
23. Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Burrells A, Lundén A. "Meat juice" is not a homogeneous serological matrix. Foodborne Pathog Dis. 2015;12 4:280-8.

24. Edelhofer R. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* in pigs in Austria—an evaluation of data from 1982 and 1992. *Parasitol Res.* 1994;80 8:642-4.
25. Kijlstra A, Eissen OA, Cornelissen J, Munniksma K, Eijck I, Kortbeek T. *Toxoplasma gondii* infection in animal-friendly pig production systems. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004;45 9:3165-9.
26. van der Giessen J, Fonville M, Bouwknegt M, Langelaar M, Vollema A. Seroprevalence of *Trichinella spiralis* and *Toxoplasma gondii* in pigs from different housing systems in The Netherlands. *Vet Parasitol.* 2007;148 3-4:371-4.
- Paștiu AI, Györke A, Blaga R, Mircean V, Rosenthal BM, Cozma V. In Romania, exposure to *Toxoplasma gondii* occurs twice as often in swine raised for familial consumption as in hunted wild boar, but occurs rarely, if ever, among fattening pigs raised in confinement. *Parasitol Res.* 2013;112 6:2403-7.
28. Dekšne G, Kirjušina M. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) and wild boars (*Sus scrofa*) in Latvia. *J Parasitol.* 2013;99 1:44-7.
29. Turčeková Ľ, Antolová D, Reiterová K, Spišák F. Occurrence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in naturally infected pigs. *Acta Parasitol.* 2013;58 3:361-6.
30. Djokic V, Blaga R, Aubert D, Durand B, Perret C, Geers R, et al. *Toxoplasma gondii* infection in pork produced in France. *Parasitology.* 2016;143 5:557-67.
31. Wallander C, Frössling J, Dórea FC, Uggla A, Vågsholm I, Lundén A. Pasture is a risk factor for *Toxoplasma gondii* infection in fattening pigs. *Vet Parasitol.* 2016;224:27-32.
32. Scala A, Giobbe M, Mula P, Pipia AP, Sanna-Coccone GN, Firinu A, et al. Toxoplasmosis: a seroepidemiological survey in pigs and boars of Sardinia. *Parassitologia.* 2008;50 1-2:235.
33. Veronesi F, Ranucci D, Branciarri R, Miraglia D, Mammoli R, Fioretti DP. Seroprevalence and risk factors for *Toxoplasma gondii* infection on finishing swine reared in the Umbria region, central Italy. *Zoonoses Public Health.* 2011;58 3:178-84.
34. Villari S, Vesco G, Petersen E, Crispo A, Buffolano W. Risk factors for toxoplasmosis in pigs bred in Sicily, Southern Italy. *Vet Parasitol.* 2009;161 1-2:1-8.
35. van Knapen F, Kremers AF, Franchimont JH, Narucka U. Prevalence of antibodies to *Toxoplasma gondii* in cattle and swine in The Netherlands: towards an integrated control of livestock production. *Vet Q.* 1995;17 3:87-91.
36. Lundén A, Lind P, Engvall EO, Gustavsson K, Uggla A, Vågsholm I. Serological survey of *Toxoplasma gondii* infection in pigs slaughtered in Sweden. *Scand J Infect Dis.* 2002;34 5:362-5.
37. García-Bocanegra I, Simon-Grifé M, Dubey JP, Casal J, Martín GE, Cabezón O, et al. Seroprevalence and risk factors associated with *Toxoplasma gondii* in domestic pigs from Spain. *Parasitol Int.* 2010;59 3:421-6.
38. Klun I, Vujančić M, Yera H, Nikolić A, Ivočić V, Bobić B, et al. *Toxoplasma gondii* infection in slaughter pigs in Serbia: seroprevalence and demonstration of parasites in blood. *Vet Res.* 2011;42:17.
39. Lopes AP, Dubey JP, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Rodrigues M, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* infection in cattle, sheep, goats and pigs from the North of Portugal for human consumption. *Vet Parasitol.* 2013;193 1-3:266-9.
40. Djokic V, Fablet C, Blaga R, Rose N, Perret C, Djurkovic-Djakovic O, et al. Factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in confined farrow-to-finish pig herds in western France: an exploratory study in 60 herds. *Parasit Vectors.* 2016;9:466.
41. Genchi C, Polidori GA, Zaghini L, Lanfranchi P. Aspetti epidemiologici della Toxoplasmosi nell'allevamento intensivo del suino. *Archivio Veterinario Italiano.* 1991;42 3:105-11.
42. de Buhr K, Ludewig M, Fehlhäber K. *Toxoplasma gondii*-seroprevalence— current results in German swine herds. *Arch Lebensmittelhygiene.* 2008;59:5-8.
43. Slány M, Reslova N, Babak V, Lorencova A. Molecular characterization of *Toxoplasma gondii* in pork meat from different production systems in the Czech Republic. *Int J Food Microbiol.* 2016;238:252-5.
44. Berger-Schoch AE, Herrmann DC, Schares G, Müller N, Bernet D, Gottstein B, et al. Prevalence and genotypes of *Toxoplasma gondii* in feline faeces (oocysts) and meat from sheep, cattle and pigs in Switzerland. *Vet Parasitol.* 2011;177 3-4:290-7.
45. Samico Fernandes EF, Samico Fernandes MF, Kim PC, de Albuquerque PP, de Souza Neto OL, de S Santos A, et al. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in slaughtered pigs in the state of Pernambuco, Brazil. *J Parasitol.* 2012;98 3:690-1.
46. Esteves F, Aguiar D, Rosado J, Costa ML, de Sousa B, Antunes F, et al. *Toxoplasma gondii* prevalence in cats from Lisbon and in pigs from centre and south of Portugal. *Vet Parasitol.* 2014;200 1-2:8-12.
47. Bacci C, Vismarra A, Mangia C, Bonardi S, Bruini I, Genchi M, et al. Detection of *Toxoplasma gondii* in free-range, organic pigs in Italy using serological and molecular methods. *Int J Food Microbiol.* 2015;202:54-6.
48. Bamba S, Halos L, Tarnagda Z, Alanio A, Macé P, Moukoury S, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and direct genotyping using minisequencing in free-range pigs in Burkina Faso. *Int J Food Microbiol.* 2016;230:10-5.
49. Hill DE, Chirukandoth S, Dubey JP, Lunney JK, Gamble HR. Comparison of detection methods for *Toxoplasma gondii* in naturally and experimentally infected swine. *Vet Parasitol.* 2006;141 1-2:9-17.
50. Juránková J, Basso W, Neumayerová H, Baláž V, Jánová E, Sidler X, et al. Brain is the predilection site of *Toxoplasma gondii* in experimentally inoculated pigs as revealed by magnetic capture and real-time PCR. *Food Microbiol.* 2014;38:167-70.
51. de Sousa S, Ajzenberg D, Canada N, Freire L, da Costa JM, Dardé ML, et al. Biologic and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* isolates from pigs from Portugal. *Vet Parasitol.* 2006;135 2:133-6.
52. Sousa S, Canada N, Correia da Costa JM, Dardé ML. Serotyping of naturally *Toxoplasma gondii* infected meat-producing animals. *Vet Parasitol.* 2010;169 1-2:24-8.
53. Lopes AP, Vilares A, Neto F, Rodrigues A, Martins T, Ferreira I, et al. Genotyping Characterization of *Toxoplasma gondii* in Cattle, Sheep, Goats and Swine from the North of Portugal. *Iran J Parasitol.* 2015;10 3:465-72.
54. Grigg ME, Sundar N. Sexual recombination punctuated by outbreaks and clonal expansions predicts *Toxoplasma gondii* population genetics. *Int J Parasitol.* 2009;39 8:925-33.
55. Bártová E, Sedláčková K, Literák I. Prevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in wild boars in the Czech Republic. *Vet Parasitol.* 2006;142 1-2:150-3.
56. Ruiz-Fons F, Vicente J, Vidal D, Höfle U, Villanúa D, Gauss C, et al. Seroprevalence of six reproductive pathogens in European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: the effect on wild boar female reproductive performance. *Theriogenology.* 2006;65 4:731-43.
57. Opsteegh M, Swart A, Fonville M, Dekkers L, van der Giessen J. Age-related *Toxoplasma gondii* seroprevalence in Dutch wild boar inconsistent with lifelong persistence of antibodies. *PLoS One.* 2011;6 1:e16240.

58. Jokelainen P, Velström K, Lassen B. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in free-ranging wild boars hunted for human consumption in Estonia. *Acta Vet Scand.* 2015;57:42.
59. Witkowski L, Czopowicz M, Nagy DA, Potarniche AV, Aoanei MA, Imomov N, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars, red deer and roe deer in Poland. *Parasite.* 2015;22:17.
- Reiterová K, Špilovská S, Blaňarová L, Derdáková M, Čobádiová A, Hisira V. Wild boar (*Sus scrofa*) - reservoir host of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Anaplasma phagocytophilum* in Slovakia. *Acta Parasitol.* 2016;61 2:255-60.
61. Ranucci D, Veronesi F, Moretti A, Branciarri R, Miraglia D, Manfredi MT, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) from Central Italy. *Parasite.* 2013;20:48.
62. Ferroglio E, Bosio F, Trisciuglio A, Zanet S. *Toxoplasma gondii* in sympatric wild herbivores and carnivores: epidemiology of infection in the Western Alps. *Parasit Vectors.* 2014;7:196.
63. Sarno E, Costanzo N, Quaranta V, Santoro AML, Stephan R. Prevalence of IgG against hepatitis E virus, *Salmonella* spp., and *Toxoplasma gondii* in meat juice samples from wild boars hunted in Southern Italy. *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene.* 2014;65 6:141-4.
64. Luptakova L, Balent P, Valencakova A, Hisira V, Petrovova E. Detection of *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon* spp. in wild boars by serological and molecular methods. *Revue De Medecine Veterinaire.* 2010;161 12:559-63.
65. Calero-Bernal R, Pérez-Martín JE, Reina D, Serrano FJ, Frontera E, Fuentes I, et al. Detection of Zoonotic Protozoa *Toxoplasma gondii* and *Sarcocystis suihominis* in Wild Boars from Spain. *Zoonoses Public Health.* 2016;63 5:346-50.
66. Coelho C, Vieira-Pinto M, Faria AS, Vale-Gonçalves H, Veloso O, Paiva-Cardoso M, et al. Serological evidence of *Toxoplasma gondii* in hunted wild boar from Portugal. *Vet Parasitol.* 2014;202 3-4:310-2.
67. Račka K, Bártová E, Budíková M, Vodrážka P. Survey of *Toxoplasma gondii* antibodies in meat juice of wild boar (*Sus scrofa*) in several districts of the Czech Republic. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22 2:231-5.
68. Wallander C, Frössling J, Vågsholm I, Uggla A, Lundén A. *Toxoplasma gondii* seroprevalence in wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden and evaluation of ELISA test performance. *Epidemiol Infect.* 2015;143 9:1913-21.
69. Richomme C, Aubert D, Gilot-Fromont E, Ajzenberg D, Mercier A, Ducrot C, et al. Genetic characterization of *Toxoplasma gondii* from wild boar (*Sus scrofa*) in France. *Vet Parasitol.* 2009;164 2-4:296-300.
70. Antolová D, Reiterová K, Dubinský P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild boars (*Sus scrofa*) in the Slovak Republic. *Ann Agric Environ Med.* 2007;14 1:71-3.
71. Gauss CB, Dubey JP, Vidal D, Ruiz F, Vicente J, Marco I, et al. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in wild pigs (*Sus scrofa*) from Spain. *Vet Parasitol.* 2005;131 1-2:151-6.
72. Jokelainen P, Näreaho A, Hälli O, Heinonen M, Sukura A. Farmed wild boars exposed to *Toxoplasma gondii* and *Trichinella* spp. *Vet Parasitol.* 2012;187 1-2:323-7.
73. Richomme C, Afonso E, Tolon V, Ducrot C, Halos L, Alliot A, et al. Seroprevalence and factors associated with *Toxoplasma gondii* infection in wild boar (*Sus scrofa*) in a Mediterranean island. *Epidemiol Infect.* 2010;138 9:1257-66.
74. Closa-Sebastia F, Casas-Diaz E, Cuenca R, Lavin S, Mentaberre G, Marco I. Antibodies to selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) from Catalonia (NE Spain). *European Journal of Wildlife Research.* 2011;57 4:977-81.
75. Dubey JP, Jones JL. *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol.* 2008;38 11:1257-78.
76. Magnino S, Frasnelli M, Fabbi M, Bianchi A, Zanoni MG, Merialdi G, et al. The monitoring of selected zoonotic diseases of wildlife in Lombardy and Emilia-Romagna, northern Italy. *Game Meat Hygiene in Focus: Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance;* 2011. p. 223-44.
77. Felin E, Jukola E, Raulo S, Fredriksson-Ahomaa M. Meat Juice Serology and Improved Food Chain Information as Control Tools for Pork-Related Public Health Hazards. *Zoonoses Public Health.* 2015;62 6:456-64.
78. Meemken D, Tangemann AH, Meermeier D, Gundlach S, Mischok D, Greiner M, et al. Establishment of serological herd profiles for zoonoses and production diseases in pigs by “meat juice multi-serology”. *Prev Vet Med.* 2014;113 4:589-98.

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

cod. ITS015TE00005(1)



1947-2017
70
YEARS
fatro

La salute animale per la salute dell'uomo

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



ONESTEP FORWARD

on PRRS



**il Riferimento
nella Prevenzione
in Salute Animale**

HUVEPHARMA

We add performance to your business



HUVEPHARMA®

We add performance to your business

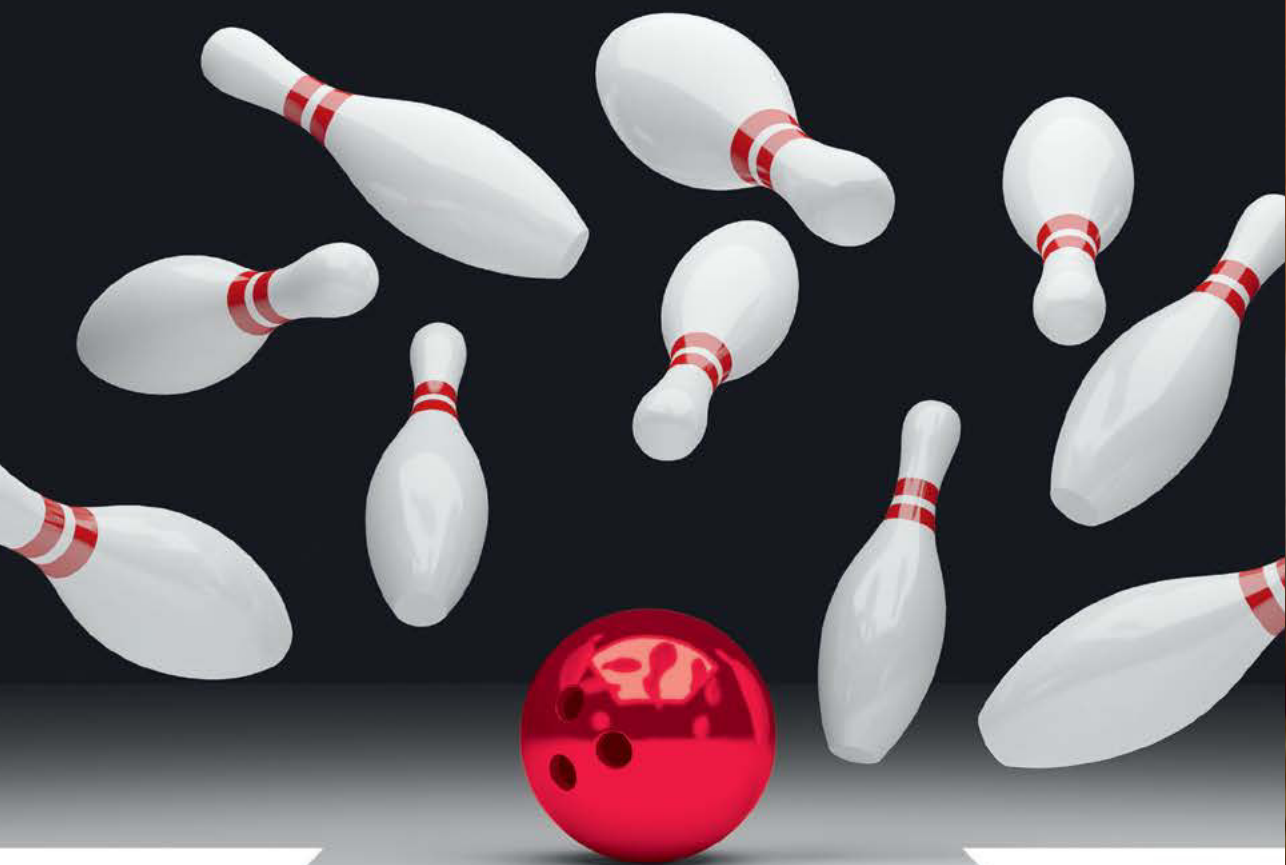


Huvepharma AD
5th Floor, 3^a Nikolay Haytov Str.
1113 Sofia, **Bulgaria**
Tel.: +359 2 862-5331
Fax: +359 2 862-5334
e-mail: sales@huvepharma.com

Huvepharma NV
Uitbreidingstraat 80
2600 Antwerp, **Belgium**
Tel.: +32 3 288 1849
Fax: +32 3 289 7845
e-mail: customerservice@huvepharma.com

Contatti per l'Italia:
gabriele.festi@huvepharma.com
paolo.mondin@huvepharma.com

SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO - SRD



**Fai strike
contro la SRD!**



**SCEGLI UN ANTIBIOTICO BATTERICIDA ONE-SHOT
PER LA TERAPIA DELLA SINDROME RESPIRATORIA DEL SUINO**

**NOI SIAMO
L'ANTICORPO
CHE PROTEGGE
LA PRODUZIONE**

Quando creiamo un nuovo vaccino o una nuova tecnologia, non facciamo solo progredire la scienza animale. Sfruttiamo la nostra competenza unita alla nostra passione per aiutare i clienti a soddisfare le più impegnative sfide produttive. Con i nostri vaccini proteggiamo gli animali dalle malattie, ne miglioriamo gli incrementi ponderali e l'efficienza produttiva. Dimostrando che insieme siamo in grado di comprendere cosa è necessario per ottenere animali sani e sviluppare un business integro.

Per maggiori informazioni, andare su msd-animal-health.it

LA SCIENZA PER ANIMALI PIU' SANI

 **MSD**
Animal Health

MSD è un marchio di Merck, Sharpe & Dohme Corp., affiliata di Merck & Co., Inc., Whitehouse Station NJ, USA. I marchi registrati utilizzati sono di proprietà di Intervet International B.V., delle sue consociate o di licenziatari e sono protetti da copyright e da altre leggi di tutela dei marchi e della proprietà intellettuale. Copyright © 2012 Intervet International B.V., affiliata di Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA. Tutti i diritti riservati.



BECAUSE LIFE IS BETTER LIVED TOGETHER

Noi siamo una cosa sola.
Siamo LIVISTO.

L'unificazione di tutti i nostri marchi aziendali nazionali nel nuovo brand globale **LIVISTO** consente ad **Industria Italiana Integratori TREI** Spa di ottimizzare le proprie attività.

Il nostro obiettivo primario è soddisfare le esigenze dei professionisti del settore veterinario, allevatori e proprietari di animali domestici.

Ora siamo più forti, lavoriamo insieme.

12 Aziende in
9 Paesi che operano con
500 dipendenti in
129 mercati con quasi
100 anni di storia

Il Gruppo **LIVISTO** sviluppa e commercializza un'ampia gamma di prodotti in segmenti chiave nel settore della salute animale.

Il portafoglio è composto da prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità per animali da reddito e domestici.



Along with you

www.livisto.com

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
italy@vetoquinol.com

vetoquinol.it



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