



ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLIV
MEETING ANNUALE



Centro Fiera del Garda - Montichiari (BS)

15-16 Marzo 2018

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA
ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2018

INDICE

Prefazione	p. 17
------------------	-------

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO QUALITÀ E SANITÀ NELL'INGRASSO *Parma, 20 Ottobre 2017*

RUOLO E IMPORTANZA DELLE PRESCRIZIONI DEI DISCIPLINARI DEI PROSCIUTTI DOP IN MATERIA DI GENETICA <i>Gallo M.</i>	p. 21
COMPETITIVITÀ DEGLI ALLEVAMENTI DA INGRASSI ITALIANI NEL CONTESTO INTERNAZIONALE <i>De Roest K., Montanari C.</i>	p. 33

ATTI DEL XLIV MEETING ANNUALE *Montichiari (BS), 15-16 Marzo 2018*

ESAME NECROSCOPICO: INTERPRETIAMO LA PATOLOGIA RESPIRA- TORIA <i>Sarli G.</i>	p. 39
QUANTI SUINI DEVO ESAMINARE? IL CALCOLO DELLA NUMEROSITÀ DEL CAMPIONE E L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI <i>Ostanello F.</i>	p. 45
LA VITA QUOTIDIANA DI UN VETERINARIO SUIATRA IN DANIMARCA - COME LAVORIAMO <i>Edahl Hoelstad B.</i>	p. 53

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

CONSUMO ANTIMICROBICO, LESIONI AL MACELLO E BENESSERE ANI- MALE: RELAZIONI NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI DA INGRASSO <i>Maisano A.M., Santucci G., Ghidini S., Scali F., Costa A., Ballista C., Zaghini L., Attanasio G., Belluzzi G., Borrello S., Candela L., Colagiorgi A., Giacomini E., Giudici F., Ianieri A., Lazzaro M., Frazzi P., Vitali A., Vezzoli F., Zanardi E., Alborali G.L.</i>	p. 57
OSSERVAZIONI PRELIMINARI SULL'USO DELLE ANIMAL BASED MEA- SURES NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI SUINI <i>Maisano A.M., Rota Nodari S., Alborali G.L., Begni E., Fadini M., Giacomini E., Invernizzi A., Lazzaro M., Lombardi G., Polloni A., Prati P., Rosignoli C., Santucci G., Scali F., Vitali A., Vezzoli F.</i>	p. 67

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XLIV Meeting Annuale, Montichiari (BS) 15 - 16 Marzo 2018.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2018.

ISBN 978-88-943304-0-3

IL RUOLO DEL TRASPORTO AL MACELLO NELLA DIFFUSIONE DELLA DISSENTERIA SUINA <i>Lazzaro M., Giacomini E., Santucci G., Maisano A.M., Scali F., Boniotti M.B., Corradi A., Gasparrini S., Pasquali P., Alborali G.L.</i>	p. 77
VALUTAZIONE DELLO STRESS DETERMINATO DALLA MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE DEL VACCINO IN SUINETTI DI CIRCA TRE SETTIMANE DI VITA <i>Minervini S., Scollo A., Cevidalli A., Bortoletto G., Gottardo F.</i>	p. 85
PREVEDERE IL RISCHIO DI MORSICATURA DELLA CODA USANDO L'ANALISI DEL CLASSIFICATION AND REGRESSION TREE <i>Scollo A., Gottardo F., Contiero B., Edwards S.A.</i>	p. 91
PERSISTENZA AMBIENTALE DI SALMONELLA E RUOLO DEGLI UCCELLI SELVATICI NELL'EPIDEMIOLOGIA DELL'INFEZIONE IN ALLEVAMENTI DI SUINI ALL'APERTO NEL REGNO UNITO <i>De Lucia A., Rabie A., Smith R.P., Davies R., Ostanello F., Martelli F.</i>	p. 99
STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS IN SUINETTI SOTTOSCRIFA IN DUE ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO <i>Ustulin M., Catania S., Gobbo F., Targhetta C., Pierasco A., Toson M., Vio D.</i>	p. 109
RISULTATI DI UN SURVEY SULLA GESTIONE DELLE SCROFETTE E SULL'ACCLIMATAMENTO VERSO MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN ITALIA <i>Andreoni S., Leotti G., Bianchi M., Dias A.S., Tommasini N.</i>	p. 117
STUDIO LONGITUDINALE E VARIABILITÀ GENOTIPICA DI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN EPISODI DI MALATTIA RESPIRATORIA IN SUINI ALL'INGRASSO <i>Tonni M., Guarneri F., Giacomini E., Pitozzi A., Lazzaro M., Scali F., Boniotti B., Alborali G.L.</i>	p. 127
DINAMICA DELL'INFEZIONE DA MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN SCROFETTE DARIMONTA IN 3 ALLEVAMENTI DI TIPO COMMERCIALE. <i>Gibellini M., Rossi R., Ferro P., Pitozzi A., Trogu E., Fusco L., Foresti F., Turco G., Boniotti B., Alborali G.L.</i>	p. 135
EFFETTO SUL BIOFILM AMBIENTALE DI UNA COLTURA MICROBICA APPLICATA NELL'AMBIENTE DELLA SALA PARTO <i>Bazzoli A., Plateau J.</i>	p. 141
UTILIZZO DEI LAVAGGI BRONCO-ALVEOLARI PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO E LA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA <i>Giacomini E., Lazzaro M., Tonni M., Leotti G.</i>	p. 151
EPIDEMIOLOGIA DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 IN NORD ITALIA <i>Legnardi M., Franzo G., Cecchinato M., Tucciarone, C.M., Sandri, G.P., Drigo, M.</i>	p. 159

LESIONI CUTANEE AL MACELLO NEL SUINO PESANTE: INDICATORI DI BENESSERE E DIFETTI SUI PROSCIUTTI <i>Bottacini M., Scollo A., Veloci M., Contiero B., Pace V., Gottardo F.</i>	p. 169
UN NUOVO APPROCCIO ALLA VALUTAZIONE DEL CONDIZIONAMENTO DELLE SCROFETTE PER IL CONTROLLO DELLA PRRS <i>Amadori M., Drigo M., Giacomini E., Lazzaro M., Pasotto D., Bilato D., Ruggeri J., Boniotti M.B., Ferlazzo G., Alborali G.L.</i>	p. 183
INDAGINE SULLE ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE DELLE CAVITÀ NASALI NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI ITALIANI <i>Polloni A., Candotti P., Ostanello F., Leotti G.</i>	p. 193
VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA DURATA DEL TRATTAMENTO CON ALTRENOGEST SULLA PORTATA AL PARTO E SULLE DIMENSIONI DELLE COVATE NELLE SCROFETTE <i>Romano G., De Rensis F., Scollo A., Mazzoni C.</i>	p. 201
EVOLUZIONE PRODUTTIVA AZIENDALE DAL 2012 AL 2016: MONITORAGGIO STATISTICO TRAMITE IL PROGETTO REPROPANEL <i>Tonon F., Romano G., Scollo A., Casappa P., Mazzoni C.</i>	p. 207
EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI PROSTAGLANDINE NATURALI NEL POST-PARTUM DELLA SCROFA NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO INDUSTRIALE <i>Raffi V., Casappa P., Mazzoni C., Scollo A.</i>	p. 219

CASI CLINICI

CASO CLINICO: FOCOLAIO DI CLOSTRIDIOSI DA CLOSTRIDIUM DIFFICILE IN SUINETTI NEONATI <i>De Lorenzi G., Pellacini M., Gherpelli Y., Gibelli L., Pangallo G., Bonilauri P., Dottori M., Luppi A.</i>	p. 229
CASO CLINICO: FOCOLAIO DI ENTERITE DA ROTAVIRUS IN SUINETTI NEONATI <i>Salogni C., Colzani A., Giovannini S., Boniotti B., Alborali G.L.</i>	p. 235
PLEUROPOLMONITE FIBRINO-NECROTICO-EMORRAGICA IN SUINETTI SOTTOSCRIFA <i>Pangallo G., Amorico A., De Lorenzi G., Gherpelli Y., Bonilauri P., Dottori M., Gibelli L., Luppi A.</i>	p. 239
MORTALITÀ IMPROVVISA IN PRIMIPARE NEL POSTPARTUM <i>Fusco L., Trogu E.</i>	p. 245

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2018

VINCITORE

- VALIDAZIONE ED APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO BASATO SU DIRECT PCR PER LA RICERCA DI MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3
Legnardi M., Franzo G., Cecchinato M., Tucciarone C. M., Drigo M...... p. 251

CANDIDATI

- NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO PER LA RICERCA DI *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE* IN MAIALI MACELLATI REGOLARMENTE
Coin P., Ceglie L., Conficoni D., Miotti Scapin R., Rampazzo E., Nardelli S., Giaccone V...... p. 273
- IMPATTO DELLA MATURITÀ SESSUALE SUL BENESSERE DEL SUINO PESANTE DA INGRASSO DI SESSO FEMMINILE
Di Martino G., Scollo A., Garbo A., Lega F., Stefani A.L., Vascellari M., Natale A., Zuliani F., Zanardello C., Tonon F., Bonfanti L...... p. 281
- VERIFICA E PREVENZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO IN SUINICOLTURA. UNA PROPOSTA OPERATIVA.
Guadagno F., Sala V...... p. 289
- DETERMINAZIONE DELL'ETA' DELLE LESIONI CUTANEE PRESENTI SULLA CARCASSA DI SUINO TRAMITE L'UTILIZZO DI UNO SPETTROFOTOMETRO E CONFRONTO CON I DATI OTTENUTI DALLE ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA, ISTOLOGIA E ATTIVITA' ENZIMATICA
Vitali M., Conte S., Lessard M., Deschêne K., Benoit-Biancamano M.O., Celeste C., Martelli G., Sardi L., Guay F., Faucitano L...... p. 301

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2018

- VALUTAZIONE DEI FATTORI PREDISponentI E STUDIO MORFOLOGICO E ISTOPATOLOGICO DELLE LESIONI POLMONARI IN SOGGETTI INFETTI DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* VACCINATI E NON VACCINATI
Parisi F., Giuliotti L., Benvenuti M. N., Rocchigiani G., Salvadori C., Poli A...... p. 321

POSTERS

- EFFETTI DELL'IMPIEGO DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* VAR. *BOULARDII* NEI SUINETTI IN POST-SVEZZAMENTO SULLE PERFORMANCE DI CRESCITA E SULLA RIMOZIONE DI ANTIBIOTICI E OSSIDO DI ZINCO
Agazzi A., Bontempo V., Savoini G., Bravo De Laguna F., Bazzoli A...... p. 337

- I VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN NORD ITALIA: CO-CIRCOLAZIONE DI DIVERSI GENOTIPI ED EVENTI DI RIASSORTIMENTO
Cavicchio L., Fusaro A., Zamperin G., Milani A., Schivo A., Mantovani C., Monne I., Vio D., Schiavon E., Mion M., Beato M.S...... p. 345

- CARATTERIZZAZIONE DI MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TIPO 3 DURANTE UN FOCOLAIO DI PED NELLA REGIONE VENETO
Cavicchio L., Zamperin G., Tassoni L., Mion M., Rizzo G., Milani A., Salviato A., Tonon F., Beato M.S...... p. 351

- VALUTAZIONE DEL RAPPORTO COSTO/BENEFICIO NELLA PRODUZIONE DEL SUINO PESANTE ITALIANO A SEGUITO DI UN PROGRAMMA VACCINALE ONE SHOT (CON HYOGEN®) VS LA POLMONITE ENZOOTICA SUINA.
Faccenda M., Rosina S., Casappa P., Cominotti F., Krejci R., Lisgara M., Mazerolles P...... p. 359

- ABOLIRE IL TAGLIO DELLA CODA NEL SUINO: EFFETTO DELLA PAGLIA COME ARRICCHIMENTO AMBIENTALE SUL CONTROLLO DELLA MORSICATURA E SULLE PERFORMANCE ZOOTECHNICHE IN SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO
Galli M.C., Scollo A., Contiero B., Gottardo F...... p. 363

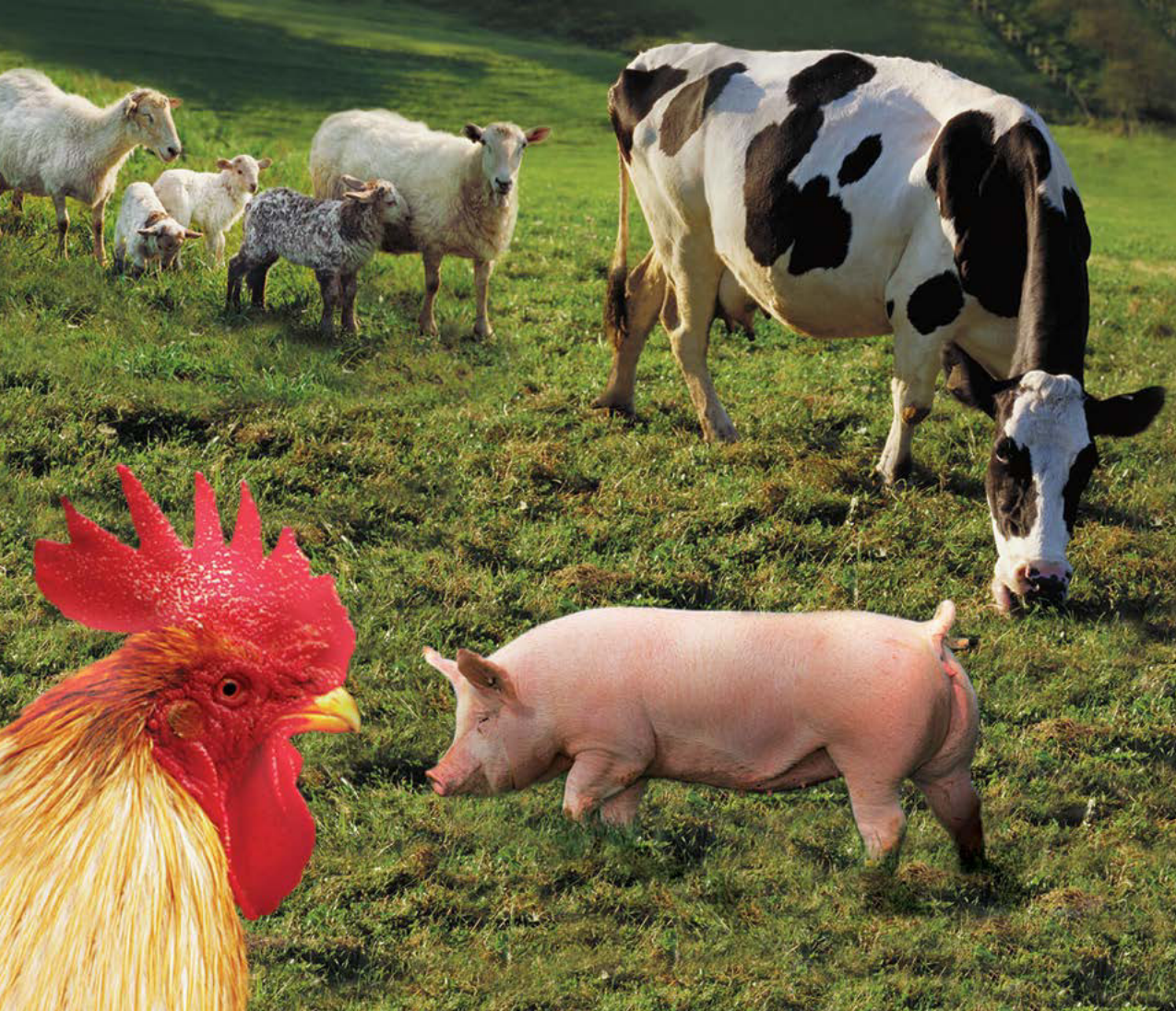
- LESIONI IATROGENE NELLE COPPE DI SUINI: DESCRIZIONE DI UN EPISODIO
Marruchella G., Odintzov Vaintrub M., Vignola G...... p. 371

- SISTEMA ALTERNATIVO PER LO SCORE DELLE PLEURITI NEI SUINI MACELLATI: INDAGINI PRELIMINARI
Marruchella G., Odintzov Vaintrub M., Di Provvido A., Farina E., Fragassi G., Vignola G...... p. 375

- IDENTIFICAZIONE DI NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA
Rizzo G., Cavicchio L., Amato L., Viera J.T., Forzan M., Ustulin M., Monne I., Vio D., Bonfanti L., Beato M.S...... p. 381

- INDAGINE SULLE PERFORMANCES PRODUTTIVE DI SCROFETTE A SEGUITO DELL'UTILIZZO DI ALTRENOGEST PER LA SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO
Romano G., Tagliaferri L., Mazzoni C., Casappa P., Scollo A...... p. 387

- IL TRATTAMENTO DELLA DIARREA SOTTOSCRFOA E LA VALUTAZIONE DELL'USO DI MOLECOLE ANTIBATTERICHE CRITICHE PER LA SALUTE UMANA
Tagliaferri L., Romano G., Casappa P., Mazzoni C., Scollo A...... p. 393



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



www.vetclub.it 



PREVENTION WORKS

Il futuro della suinicoltura
è nelle vostre mani

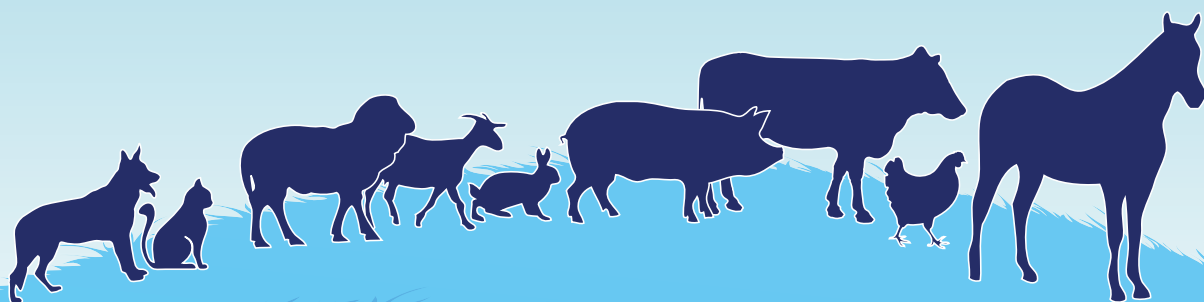


Boehringer
Ingelheim



CALIER

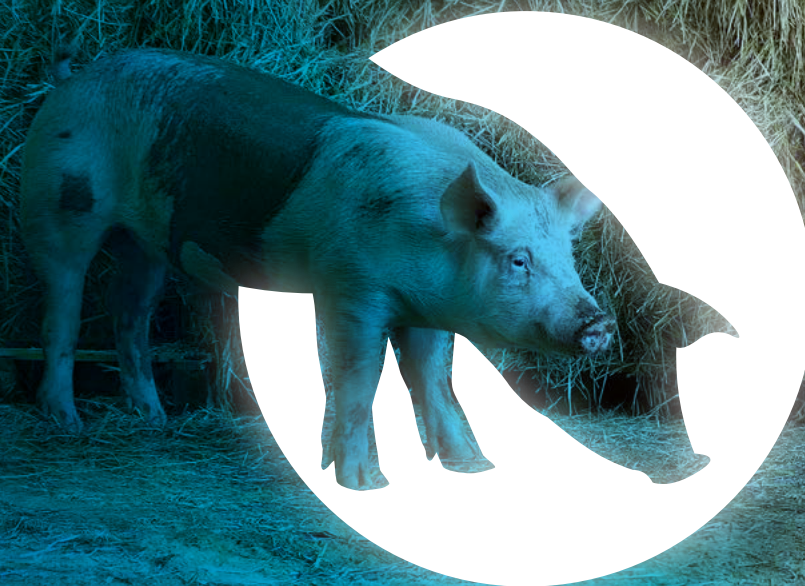
Committed to animal welfare



UN'IMPRESA DEL **GRUPPO INDUKERN**



Un nuovo
punto di riferimento
per il futuro...



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

A.A. LES POINTS SUR L'ES.A. - Photo Credit: Getty Images / Photo and Co.

Together, beyond animal health



OVUNQUE CI PORTI IL FUTURO
GARANTIAMO LA LORO SALUTE



la più VASTA GAMMA
di TERAPIE
FARMACEUTICHE

una SELEZIONE
di VACCINI INNOVATIVI

SOLUZIONI di
BIO-SICUREZZA
TESTATE ed EFFICACI



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



Produzione e commercializzazione
di farmaci veterinari in tutto il mondo



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



PREFAZIONE

Cari soci e colleghi,

è con estremo piacere che scrivo queste righe che vi daranno il benvenuto – a nome di tutto il Consiglio Direttivo - al 44° Meeting Annuale della SIPAS che anche quest'anno si svolgerà a Montichiari presso il Centro Fiera del Garda. Il nostro incontro di primavera ha sempre rappresentato il momento clou per le attività e la “vita” della nostra Società. Quest'anno ancor di più perché vi illustreremo in Assemblea alcune piccole, ma importanti, modifiche apportate allo statuto della SIPAS che sono state votate nel corso dell'Assemblea Straordinaria tenutasi lo scorso 12 febbraio 2018 a Brescia presso la sede dell'Istituto Zooprofilattico. Queste modifiche si sono rese necessarie affinché la SIPAS possa essere inserita nell'elenco delle società scientifiche che il Ministero della Salute potrà e vorrà consultare per tutto quanto riguarda la sanità animale. Penso che sia importante e fondamentale che i nostri soci possano far sentire la loro voce, attraverso la Società che li rappresenta, quando in ambito ministeriale si discuterà di argomenti che toccano da vicino la realtà della nostra industria: dal benessere animale all'utilizzo del farmaco/antibiotico, fino ai piani di controllo ed eradicazione delle malattie.

Anche quest'anno il Consiglio Direttivo ha lavorato per organizzare un Meeting che corrisponda agli interessi più attuali dei Soci aiutandoli in modo pratico nello svolgimento delle loro attività quotidiane. Nella prima giornata di giovedì pomeriggio, oltre alle prime comunicazioni scientifiche dei Soci (29 in totale più due casi clinici), si terrà la prima tavola rotonda che avrà per tema l'approccio aziendale alla diagnosi in allevamento. I due relatori ci aiuteranno a meglio capire quanti e quali campionamenti è utile effettuare e come “interpretare” le risposte. Nella giornata di venerdì la seconda tavola rotonda affronterà il tema di quale debba essere il ruolo del veterinario aziendale. Argomento questo importantissimo anche alla luce della legge recentemente approvata. Il dr. Borrello spiegherà quali dovranno essere le funzioni/attività/responsabilità del veterinario aziendale nella visione del Ministero della Salute mentre altri colleghi, italiani, francesi e danesi si confronteranno raccontando le proprie esperienze nello svolgimento della loro attività quotidiana.

Come tradizione, nel corso della giornata, verranno anche assegnati il Premio Pierfilippo Guadagnini e il Premio giovane Laureato 2018 quali riconoscimento all'attività svolta da giovani colleghi. Giovani colleghi che speriamo di vedere sempre più presenti e attivi nella vita della Società.

Nel Volume degli Atti troverete naturalmente anche tutte le 29 comunicazioni scientifiche più 2 casi clinici presentate dai Soci e i lavori dell'Incontro Autunnale della Società svoltosi a Parma lo scorso 20 ottobre 2017.

Un ringraziamento sentito a tutte le Industrie di Salute Animale per il sostegno, non solo finanziario, che rende possibile lo svolgimento delle attività della SIPAS e alla segreteria di MV Congressi per l'eccellente organizzazione. Grazie anche a tutti voi Soci a cui chiediamo una partecipazione sempre più attiva alla vita della Società.

Vice Presidente SIPAS
Giampietro Sandri

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**QUALITÀ E SANITÀ
NELL'INGRASSO**

Parma, 20 Ottobre 2017

RUOLO E IMPORTANZA DELLE PRESCRIZIONI DEI DISCIPLINARI DEI PROSCIUTTI DOP IN MATERIA DI GENETICA

GALLO M.

Premessa

I prosciutti di Parma e San Daniele rappresentano il 94,6% della produzione (11.712.737 su 12.378.179 pezzi) realizzata nel 2016 dagli otto prosciutti con riconoscimento DOP “Denominazione di Origine Protetta” e la loro regolamentazione è il modello di riferimento anche per gli altri prodotti trasformati DOP a base di carne suina (Tab 1). Per questo nel seguito si prendono in considerazione questi due prodotti leader che quarantasette anni fa con le leggi del 4 luglio 1970 n. 506 il prosciutto di Parma e n. 507 il prosciutto di San Daniele ottennero il riconoscimento nazionale della Denominazione di Origine Controllata (DOC). Con le leggi n. 26 e n. 30 del 13 febbraio 1990 la loro regolamentazione fu estesa all’intera filiera: dalla fase di stagionatura a quelle di allevamento e macellazione. Le relative norme esecutive furono approvate con Decreti ministeriali il 15 febbraio 1993, dopo un serrato confronto tra le rappresentanze dei vari anelli della filiera, supportate da esperti del mondo della ricerca.

Nello stesso periodo l’allora Consiglio delle Comunità europee promulgò il Regolamento CEE 2081/92 del 14 luglio 1992¹ che introdusse la protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni di origine. Nel 1996 i due prosciutti ottennero la protezione europea (DOP)² con il ricorso alla procedura in deroga, di cui all’art 2 del Regolamento CEE 2081/92, esercitabile fino al 2004 per le denominazioni che già si fregiavano di un riconoscimento nazionale. Grazie a questa particolarità fu possibile ottenere il riconoscimento di un’area geografica per gli allevamenti (10 regioni per ciascuna DOP) più ampia di quella di trasformazione del prodotto.

Tab. 1 Prodotti DOP a base di carne suina

PROSCIUTTI	PARMA, SAN DANIELE, TOSCANO, MODENA, VENETO, CARPEGNA, CUNEO, JAMBON DE BOSSES, CULATELLO DI ZIBELLO
SALUMI	SALAMINI ITALIANI ALLA CACCIATORA, SALAME BRIANZA, SALAME DI VARZI, SALAME PIACENTINO, COPPA PIACENTINA, PANCETTA PIACENTINA, SOPRESSA VICENTINA, LARD D’ARNARD, SALSICCIA - SOPRESSATA - CAPOCOLLO - PANCETTA DI CALABRIA
CARNI	CINTA SENESE

Norme UE

Tra il 1992 e il 2012 sono stati emanati tre Regolamenti comunitari. Il primo è il Reg. (CEE) 2018/92 che ha istituito la protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d’origine, il secondo è il Reg. (CE) 510/2006³, che ha abrogato il precedente e ha introdotto alcune novità, tra le quali le modalità di controllo nel rispetto del Reg. 882/2004 e le modalità

di presentazione e di approvazione delle domande. Il terzo è il Reg. (UE) 1151/2012⁴ che ha abrogato il Regolamento (CE) 510/2006 ed ha esteso il suo ambito di applicazione a tutti i regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari, comprendendo quindi anche le specialità tradizionali garantite (STG) e le indicazioni facoltative di qualità.

Principi ed obiettivi

Per quanto riguarda le denominazioni di origine, il principio cardine per il riconoscimento di un prodotto è che “...la qualità o le caratteristiche siano dovute essenzialmente o esclusivamente all’ambiente geografico comprensivo dei fattori naturali ed umani e la cui produzione, trasformazione ed elaborazione avvengano nell’area geografica delimitata.” (p.to 2, lett. a) art 2 Reg (CEE) 2081/92)

Il quadro normativo è evoluto negli anni per aggiornare aspetti procedurali e comprendere l’insieme dei regimi di qualità, ma ha sempre confermato i principi di base e ribadito gli obiettivi politico-strategici.

In particolare il legislatore ha messo in evidenza che “la qualità e la varietà della produzione agricola...rappresentano un punto di forza e un vantaggio competitivo importante per i produttori dell’Unione e sono parte integrante del patrimonio culturale e gastronomico vivo. Ciò è dovuto alle competenze e determinazione degli agricoltori e produttori, che hanno saputo preservare le tradizioni pur tenendo conto dell’evoluzione dei nuovi metodi e materiali produttivi (Cons. 1 Reg. (UE)1151/2012) e che “sempre di più, i cittadini e consumatori dell’Unione chiedono qualità e prodotti tradizionali e si preoccupano del mantenimento della varietà della produzione agricola dell’Unione. Queste esigenze determinano una domanda di prodotti agricoli o alimentari con caratteristiche specifiche riconoscibili, in particolar modo quelle connesse all’origine geografica.” (Cons. 2 Reg. (UE) 1151/2012)

Gli obiettivi della regolamentazione europea si possono schematicamente riassumere come segue: 1) diversificare la produzione agricola; 2) valorizzare il nesso tra la qualità e l’origine; 3) bilanciare l’offerta e la domanda; 4) migliorare il reddito degli agricoltori; 5) informare in modo chiaro e trasparente il consumatore.

I prodotti DOP presentano caratteristiche qualitative che li differenziano dal prodotto generico. La legislazione europea nel riconoscere questa particolarità mette a disposizione gli strumenti per attuare comportamenti e politiche produttive che conservino gli elementi distintivi, tra cui la valorizzazione del nesso tra qualità e origine.

L’origine comprende aspetti sia naturali che umani, tra questi le pratiche di allevamento dei suini e di lavorazione delle cosce. Nel caso dei prosciutti sono determinanti le caratteristiche della materia prima utilizzata, che derivano da pratiche di miglioramento genetico delle razze, attuate nel rispetto della tradizione e tenendo conto dell’evoluzione delle conoscenze scientifiche.

La diversificazione qualitativa è una condizione necessaria per difendere il prodotto dal rischio sostituzione e concorrenza dei prodotti succedanei e dal conseguente schiacciamento di prezzi e margini con pregiudizio per il reddito degli agricoltori e dei trasformatori. E’ uno dei rischi a cui ci si espone anche la filiera DOP quando si fanno spazio logiche e comportamenti diversi da quelli indicati dalle norme europee e dai Disciplinari.

Per salvaguardare il reddito degli operatori è importante anche l’oculata gestione dell’offerta. In proposito l’applicazione negli ultimi tre anni (2015-2017) della regolazione dell’offerta da parte dei Consorzi di tutela di Parma e San Daniele (ai sensi dell’art 172 del Reg. UE 1308/2013 sull’organizzazione comune dei mercati agricoli) ha contribuito alla ripresa della generazione di valore.

Infine, la fiducia del consumatore verso le produzioni DOP non deve essere tradita con pratiche che non siano pienamente rispettose dei Disciplinari.

Disciplinari dei prosciutti DOP di Parma e San Daniele^{6, 7}

Di seguito si riportano in modo sintetico i requisiti più rilevanti per la definizione della conformità del prodotto.

Tab. 2 Requisiti dei Disciplinari dei prosciutti DOP

FASE	CATEGORIA	REQUISITO
SUINO	ETA’	Almeno 9 mesi
	PESO VIVO	Kg 160 +/-10%
	RAZZE	LWI, LI, DI e altre compatibili
CARCASSA	PESO	> 110 Kg (H - Heavy)
	CLASSI	U, R, O
COSCIA	PESO	Almeno 10 Kg
	SPESSORE LARDO	Almeno 20 mm
	QUALITA’ LARDO	N. Iodio < 70/Ac. Linoleico < 15%
	DIFETTI	Infiltraz. Grasso; PSE; ...
	CONSISTENZA MUSCOLARE	Attività proteolitica a fine stagionatura

Per quanto riguarda la genetica del suino, i Disciplinari precisano che “...sono ammessi gli animali, in purezza o derivati, dalle razze tradizionali così come migliorate dal Libro genealogico italiano..” e “...gli animali di altre razze, meticci e ibridi, purché provengano da schemi di selezione o incrocio attuati con finalità non incompatibili con quelle del Libro genealogico italiano per la produzione del suino pesante...”

Si può affermare che i Disciplinari riconoscono il ruolo della selezione del Libro genealogico italiano, che ha specifici obiettivi per la produzione del suino pesante. Questa particolare selezione coniuga la tradizione e la possibilità di miglioramento. Il richiamo alla tradizione è esplicito nell’indicazione delle razze italiane, mentre l’evoluzione tecnica è definita dalla precisazione che si tratta di razze “migliorate”. La selezione modifica in modo permanente di generazione in generazione le caratteristiche degli animali. In questo caso, le modifiche migliorative sono e devono essere nel solco della tradizione per la produzione del suino pesante. Di conseguenza, altre eventuali razze o tipi genetici sono idonee per la produzione DOP solo se progettati ed attuati nel rispetto di questo tipo di indirizzo.

Per comprendere appieno l’importanza del rispetto dei principi enunciati nei Disciplinari circa la genetica è interessante dare uno sguardo ai dati dell’omologazione delle cosce destinate al circuito DOP. Nel 2016 più di un quinto delle cosce (circa 3,5 milioni di pezzi) (tab 3) ottenute da suini consegnati al macello con CUC (certificazione unificata di conformità) non è risultato conforme alla verifica di macello, prosciuttificio e organismi di controllo. Questo stato di cose può essere in larga parte imputabile all’origine genetica di suini che vengono avviati alla macellazione per le DOP pur non possedendo caratteristiche intrinseche adeguate. E’ evidente che l’entità dello scarto non è compatibile con gli obiettivi della filiera e tanto meno con la sostenibilità economica dell’allevamento e della trasformazione.

Tab. 3 Utilizzo cosce disponibili

Dati 2016 (IPQ - INEQ)	COSCE N.	%
DISPONIBILI (CUC ALLEVAMENTO)	15.875.826	100,00
COSCE PP (MACELLO)	13.643.792	85,94
COSCE OMOLAGATE (PROSCIUTTIFICIO)	12.378.179	77,97

Genetica e identità del prodotto

I Disciplinari descrivono con precisione i requisiti che deve presentare la coscia (Tab 2), per esempio la copertura minima di lardo, la qualità del lardo (rapporto tra acidi grassi saturi ed insaturi), un moderato deposito di tessuto adiposo tra le fibre muscolari (noce di grasso e marezzatura), l’attività proteolitica della parte magra (indice di proteolisi) e l’assenza di difetti come venature, ecchimosi, carni pallide (PSE), ecc.. Inoltre, le cosce devono appartenere a carcasse pesanti (H) con un contenuto di carne magra moderato (le classi di carnosità U, R, O). Le cosce in possesso di questi requisiti possono venir stagionate con ridotti contenuti di sale e realizzano buone performance tecnologiche e sensoriali.

Le caratteristiche sopra descritte hanno una importante componente genetica. I caratteri deposito di carne magra e di grasso sono altamente ereditabili, inoltre esiste un antagonismo genetico molto rilevante tra la qualità della carne per la trasformazione in prosciutto e la quantità di carne magra¹⁸. A titolo esemplificativo si riportano di seguito le correlazioni genetiche tra la percentuale di carne magra della carcassa e alcuni importanti caratteri produttivi (IMG incremento medio giornaliero, ICA indice conversione alimentare), la qualità della carne per la stagionatura e lo spessore del lardo dorsale (*fonti bibliografiche varie ed ANAS*)

Tab. 4 Correlazioni genetiche

CARATTERI	CORRELAZIONE GENETICA CON % CARNE MAGRA	
IMG incremento medio giornaliero	+0,2 / +0,4	Moderata favorevole
ICA indice conversione alimentare	-0,3 / -0,4	Moderata favorevole
QUALITA’ STAGIONATURA	-0,7 / -0,8	Alta sfavorevole
SPESSORE LARDO DORSALE	-0,6 / -0,7	Alta sfavorevole

Le suinicolture degli altri paesi hanno come principale obiettivo la massimizzazione della produzione di carcasse magre e di conseguenza i programmi di selezione puntano ad ottenere

il massimo progresso genetico per un efficiente deposito di carne magra. Questo tipo di selezione, a causa dell’antagonismo tra caratteri prima richiamato, provoca però un costante deterioramento delle caratteristiche qualitative delle carni ed in modo particolare della qualità per la stagionatura. La selezione di razze e tipi genetici per la produzione DOP deve invece prioritariamente salvaguardare gli aspetti qualitativi della coscia. Per questo i programmi di selezione devono definire obiettivi diversi da quelli comunemente perseguiti negli altri paesi, prevedere la misurazione di idonei indicatori, stimare il valore genetico per i caratteri che definiscono la qualità per la stagionatura e pianificare di conseguenza la riproduzione dei soggetti selezionati.

L’esperienza del Libro genealogico italiano

Gli obiettivi della selezione del Libro genealogico italiano abbinano il mantenimento della qualità della coscia per la stagionatura e il miglioramento delle prestazioni in allevamento ed al macello per garantire la sostenibilità economica dell’attività (artt. 19, 21, 22 “Finalità e criteri della selezione” - Disciplinare del Libro genealogico; Disciplinare per le prove in stazione della specie suina)^{11,12}

In particolare per permettere il mantenimento della qualità della coscia è stato messo a punto un originale indicatore della qualità tecnologica e sensoriale del prosciutto ed è stata prevista una particolare modalità di controllo della copertura di lardo della coscia e della distribuzione del grasso tra le fibre muscolari della coscia stessa. L’indicatore della qualità tecnologica e sensoriale viene misurato nelle prime fasi del processo di trasformazione delle cosce, è denominato calo di prima salagione (CALO) e presenta un’alta correlazione genetica con la resa di stagionatura: Bosi et al.¹³ Buttazzoni et al.¹⁴; Russo et al.¹⁹ La distribuzione del grasso tra i muscoli della coscia è rilevato con un altro originale parametro denominato Grasso Intermuscolare Visibile (GIV).

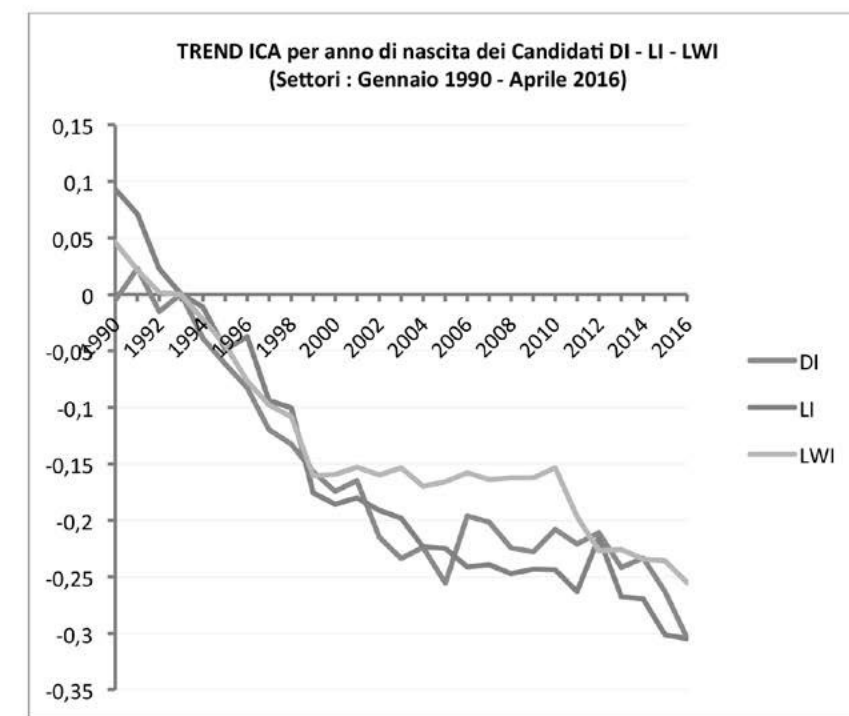
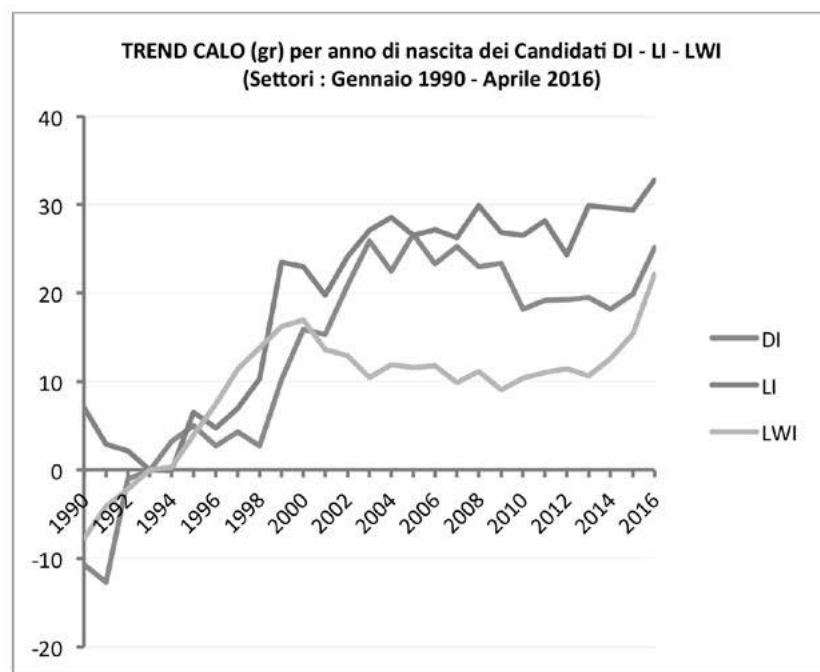
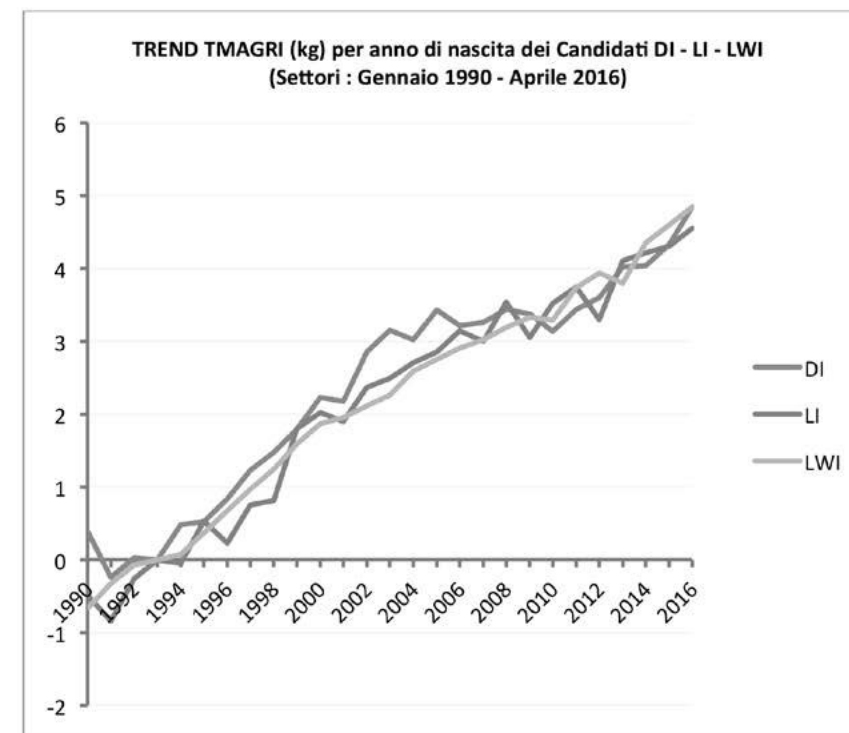
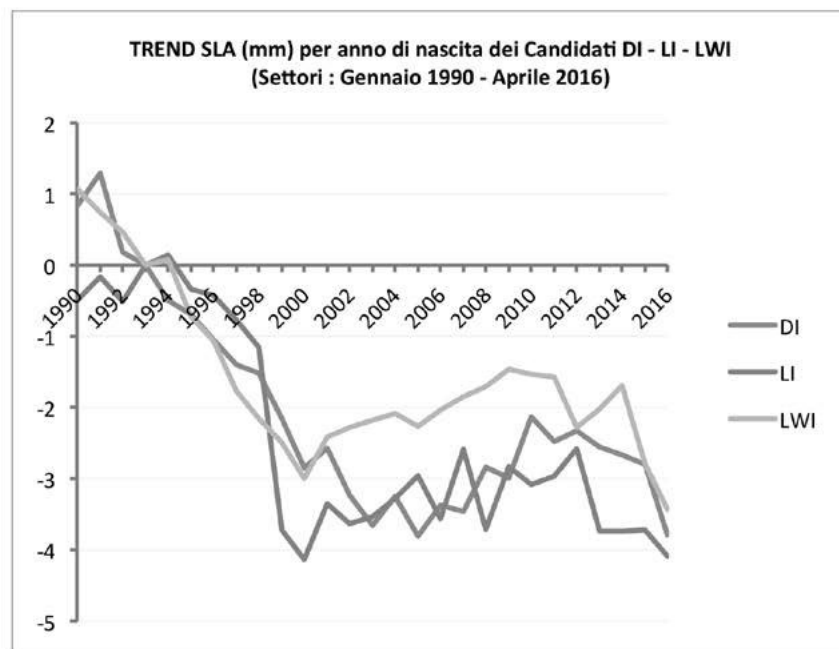
In sintesi, la selezione per il suino pesante ha un approccio che non guarda solo al breve periodo (la mera riduzione dei costi di produzione) ma alla sostenibilità nel lungo periodo della filiera DOP. La specificità della selezione italiana per il suino pesante è stata riconosciuta anche a livello europeo. Infatti, il Libro genealogico italiano è l’unico che ha potuto istituire una sezione separata (esteri) per registrare e segregare i riproduttori provenienti da altre selezioni. Questa misura era prevista dalla Direttiva (CEE) 661/88 ed è stata confermata solo per l’ANAS dal Regolamento Zootechnia (UE) 1012/2016 per impedire che l’uso di riproduttori selezionati con obiettivi incompatibili possa ostacolare il regolare sviluppo del programma genetico delle razze italiane per il suino pesante.

Lo sviluppo delle tre razze migliorate

Il programma di selezione del Libro genealogico che viene continuamente affinato sulla base delle nuove conoscenze scientifiche ha plasmato le tre razze del suino pesante nella direzione indicata dagli obiettivi prima descritti. La conferma è data dai trend genetici realizzati nel corso degli anni per i caratteri considerati e dall’accertata modifica della frequenza di alcuni geni connessi.

- Trend genetici realizzati

Di seguito i grafici riportano l’andamento annuale del valore genetico medio delle tre razze per i caratteri Spessore lardo dorsale (SLA), Resa stagionatura (CALO), Tagli magri e Indice conversione alimentare ICA. E’ importante sottolineare che i caratteri Spessore lardo e CALO (qualità della coscia) sono stati consolidati e mantenuti inalterati rispetto al livello genetico raggiunto nel 2000, mentre i caratteri produttivi: Tagli e ICA presentano un costante incremento annuale. In particolare, rispetto al 1990, il progresso genetico è stato per i Tagli magri (coppe e lombi) di circa 5 Kg di peso e per l’indice conversione alimentare di circa 400 g di mangime risparmiato per Kg di peso vivo.



La selezione ha permesso l'aumento dell'efficienza in allevamento ed al macello senza compromettere il profilo qualitativo delle cosce. Le razze italiane del suino pesante hanno caratteristiche particolari per la qualità tecnologica ed organolettica delle carni. Si tratta di un patrimonio di interesse pubblico a tutela dei prosciutti DOP di Parma e San Daniele.

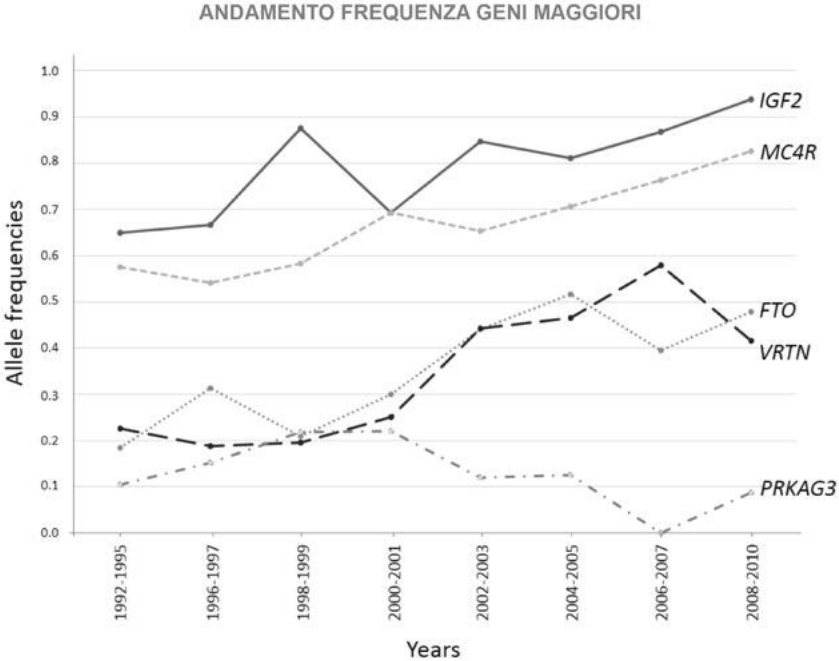
- Modifica frequenza geni maggiori

Il sequenziamento del genoma suino e la possibilità di analizzarlo con un numero elevato di marcatori ha aperto nuove prospettive nel campo del miglioramento genetico. E' stata condotta un'indagine per verificare quanto la selezione basata sulla stima del valore genetico fatta con il BLUP *Animal Model* (attività SIB Test) può modificare la frequenza degli alleli nella razza interessata. Sono stati scelti tra i verri di razza Large White italiana nati dal 1992 al 2012 n. 200 verri con un'accuratezza della stima del valore genetico superiore a 0,85. In tabella sono riportati i dati medi del valore genetico per alcuni caratteri, i verri sono raggruppati per periodo di nascita. I caratteri considerati sono: IMG incremento medio giornaliero; LARDO spessore lardo dorsale; ICA Indice conversione alimentare; COSCIA peso coscia; TAGLI peso coppe e lombi.

Tab. 5 Valore genetico gruppo verri per periodo nascita e carattere

Anno	Verri	Accuratezza Indice gen.	Indice gen. IMG	Indice gen. LARDO	Indice gen. ICA	Indice gen. COSCIA	Indice gen. TAGLI MAG.
	n.		(g)	(mm)		(kg)	(kg)
1992-1995	22	0.904 ± 0.012	9.500 ± 30.226	-2.448 ± 2.888	-0.069 ± 0.177	0.438 ± 0.599	0.817 ± 1.399
1996-1997	24	0.914 ± 0.017	36.375 ± 33.618	-3.726 ± 3.577	-0.210 ± 0.179	0.567 ± 0.639	2.099 ± 1.736
1998-1999	25	0.928 ± 0.028	40.720 ± 30.867	-3.748 ± 3.400	-0.168 ± 0.164	0.679 ± 0.581	2.858 ± 1.684
2000-2001	26	0.941 ± 0.025	35.615 ± 28.625	-2.364 ± 3.457	-0.127 ± 0.150	0.558 ± 0.690	2.370 ± 1.821
2002-2003	27	0.937 ± 0.028	47.333 ± 26.482	-2.381 ± 3.482	-0.188 ± 0.126	0.648 ± 0.602	3.507 ± 1.492
2004-2005	30	0.932 ± 0.024	43.100 ± 18.415	-1.095 ± 3.162	-0.152 ± 0.088	0.539 ± 0.455	3.242 ± 1.276
2006-2007	21	0.939 ± 0.029	49.000 ± 15.473	-0.362 ± 2.157	-0.177 ± 0.092	0.732 ± 0.443	3.732 ± 1.318
2008-2010	25	0.940 ± 0.026	52.680 ± 27.536	-1.721 ± 2.262	-0.188 ± 0.133	0.668 ± 0.614	4.324 ± 1.430

Tutti i verri sono stati genotipizzati con marcatori per alcuni geni maggiori: IGF2, MC4R, VRTN, PRKAAG3, FTO. IGF2 *Insuline-like growth factor 2*: questo gene presenta un allele (A) associato con un maggior contenuto di tagli della carcassa (coppe, lombi e cosce), un miglior accrescimento giornaliero e indice di conversione degli alimenti, e con lo spessore del lardo. MC4R *melanocrtin 4 receptor* è un gene associato con lo spessore del lardo, l'incremento giornaliero e l'indice di conversione alimentare. VRTN *vertnin* questo gene ha un allele (Q) associato con un maggior numero di vertebre che può avere una relazione positiva sia con il peso dei tagli della carcassa che con i parametri riproduttivi. PRKAAG3 è un gene che influenza la qualità della carne. FTO è associato alla deposizione adiposa. I dati sono stati elaborati statisticamente con regressioni multinomiali. Quattro dei cinque polimorfismi indagati hanno presentato modificazioni significative (P <0,01) della frequenza degli alleli nel tempo. L'andamento nel tempo della frequenza degli alleli indagati è riportata nel seguente grafico.



La frequenza degli alleli associati ad un maggior contenuto di carne, accrescimento giornaliero e una più favorevole conversione alimentare (IGF2 e MC4R) sono costantemente aumentate negli anni, i valori raggiunti sono prossimi al 100%. La frequenza degli alleli associati al deposito di lardo (FTO) e sviluppo corporeo (VRTN) si è stabilizzata a partire dal 2000. Mentre la frequenza degli alleli del gene associato alla qualità della carne (PRKAAG3) non ha subito modifiche significative. Questi risultati genomici sono sovrapponibili ai trend degli indici genetici riportati nei precedenti grafici e confermano che la selezione del Libro genealogico ha sia migliorato le *performance* produttive sia consolidato le caratteristiche che definiscono la qualità della coscia e della carne per la stagionatura. Lo studio è stato pubblicato su *Journal of Animal Breeding and Genetics*¹⁵ e su *Animal Genetics*²⁰

- Informazioni genomiche e qualità del prosciutto

Il calo di salagione è il parametro originale della selezione delle razze italiane per il suino pesante destinato al circuito DOP, predice la resa finale in stagionatura, è correlato con l'attività degli enzimi proteolitici ed è altamente ereditabile. Di recente, DISTAL dell'Università di Bologna in collaborazione con ANAS ha effettuato studi di *Genome Wide Association*". Una di queste indagini ha richiesto la genotipizzazione con pannello Illumina SNPs 60K di 1.365 suini di razza Large White italiana, selezionati da ANAS per l'idoneità alla produzione di prosciutti DOP. Sono stati individuati 44 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) che identificano almeno 29 QTL (*Quantitative Trait Loci*) associati al parametro sopra richiamato. I polimorfismi individuati sono responsabili di piccoli effetti, i più significativi spiegano circa il 3% della variabilità genetica del carattere. Il risultato ottenuto dimostra che la qualità della coscia è un carattere complesso che non può essere spiegato da pochi geni "maggiori", ma da numerosi geni ad effetto minore. Si tratta di una conferma della particolarità della selezione italiana e del fatto che la qualità della carne per la stagionatura può essere realizzata, accumulando di generazione in generazione gli effetti positivi, solamente con un paziente e lungo lavoro di miglioramento genetico. Lo studio è stato pubblicato su *Animal Genetics*¹⁷

Applicazione Disciplinari e Piani di controllo^{8,9}

L'applicazione dei Disciplinari è soggetto all'attività di controllo delle autorità competenti degli Stati membri o di Organismi privati con i requisiti stabiliti nella norma EN 45011 del 26 giugno 1989 (artt. 35-39 Regolamento UE 1151/2012).

Per quanto riguarda il rispetto dei requisiti circa la genetica dei suini si possono indicare tre diversi livelli. Il primo è l'autocertificazione da parte degli allevatori della denominazione della razza o tipo genetico del verro padre dei suini movimentati verso altri allevamenti (CI: certificazione intermedia) o verso il macello (CUC: certificazione unificata di conformità). Il secondo si sostanzia nell'attività di controllo dell'identità dei verri dichiarati (certificati zootecnici, identificativo individuale sull'animale, ecc.) da parte degli ispettori degli Organismi di controllo. Il terzo riguarda l'attività degli Organismi di controllo per la validazione della compatibilità di razze e tipi genetici ibridi, diversi dalle tre razze del Libro genealogico italiano. Per quanto riguarda la validazione di razze e tipi genetici ibridi da parte degli Organismi di controllo IPQ (Istituto Parma Qualità) e INEQ (Istituto Nord Est Qualità), è opportuno richiamare la procedura dettagliatamente descritta nella Dispensa Servizi unificati IPQ - INEQ 2006¹⁰

In sintesi, i due Organismi raccolgono con apposite *check list*, compilate dagli Enti selezionatori o ibridatori responsabili dei programmi genetici e della certificazione dei riproduttori, i dati circa gli obiettivi e i criteri di selezione adottati, l'importanza relativa attribuita ai singoli caratteri considerati, il progresso genetico atteso, ecc.. Sulla base dell'esito della verifica delle informazioni fornite, gli Organismi di controllo stabiliscono se una razza o un tipo genetico ibrido soddisfa il requisito dei Disciplinari, ossia stabiliscono se lo schema di selezione o incrocio è stato attuato con finalità non incompatibili con quelle del Libro genealogico per la produzione del suino pesante.

Le attività istruttorie fin qui condotte dai sopra menzionati Organismi di controllo hanno portato all'esclusione di alcune razze e tipi genetici ibridi. La lista di razze e tipi genetici esclusi è pubblicata sui portali dei predetti Organismi (cfr. Elenco tipi genetici accertati non conformi; rev. 8 del 9 marzo 2016).

- Alcune criticità

L'esperienza di questi anni ha evidenziato alcuni punti critici. L'autocertificazione della razza o tipo genetico ibrido da parte dell'allevatore non è esente da errori e imprecisioni (in fase di compilazione delle CI e delle CUC), e talvolta può essere inficiata da comportamenti fraudolenti. Inoltre, l'autocertificazione riguarda solamente il verro padre, mentre mancano le informazioni sulla componente genetica femminile. L'attività ispettiva presso gli allevamenti è risultata talvolta difficoltosa e lacunosa nell'accertamento dell'identità dei verri utilizzati, sia presenti in allevamento che presso centri produzione seme. Infine, l'aspetto più problematico è legato al fatto che razze e tipi genetici ibridi che non sono stati oggetto di valutazione da parte degli Organismi di controllo possono essere utilizzati. Questa situazione costituisce un rischio per il sistema perché non consente di impedire l'eventuale immissione di prodotto idoneo per le lavorazioni DOP.

Alla luce di quanto sopra sono auspicabili alcuni aggiornamenti dei piani di controllo.

- Autocertificazione

In merito alle informazioni su razze e tipi genetici ibridi usati è opportuno l'avvio della raccolta di informazioni sull'origine genetica delle scrofe madri dei suini destinati alle lavorazioni DOP.

- Attività ispettiva e tracciabilità genetica

La verifica dell'identità dei verri utilizzati può essere resa più incisiva con la previsione della tracciabilità genetica. In particolare, si tratterebbe di prevedere per ogni verro la raccolta e conservazione di un campione biologico per l'estrazione del DNA o la registrazione delle informazioni riguardanti alcuni marcatori del DNA (per esempio Microsatelliti validati

dall'*International Society of Animal Genetics* - ISAG). In questo modo gli Organismi di controllo potrebbero accertare a campione sia l'identità dei verri in uso, sia la paternità della progenie certificata e dei prodotti da essa derivati.

- Validazione altre razze e tipi genetici ibridi

E' utile prevedere la verifica preventiva, con le procedure ormai collaudate descritte nella Dispensa Servizi unificati IPQ - INEQ 2006¹⁰ della compatibilità degli schemi di selezione e ibridazione di tipi genetici destinati al sistema delle DOP. I tipi genetici ammessi verrebbero riportati in una apposita lista pubblica mentre quelli privi di valutazione o accertati incompatibili non potrebbero essere utilizzati.

CONCLUSIONI

Il comparto dei prosciutti DOP, con il suo contenuto di tipicità, differenziazione qualitativa e legame col territorio, è l'asse portante della suinicoltura italiana. Questo sistema ha dimostrato di generare nelle condizioni italiane maggior valore rispetto ad altri tipi di produzione. Infatti, nel triennio 2014-2016 caratterizzato da una sfavorevole congiuntura economica che ha provocato una significativa contrazione produttiva, il numero dei suini destinati alle lavorazioni DOP è rimasto sostanzialmente invariato, tant'è che l'incidenza percentuale sul totale dei suini nati ed allevati in Italia è passata dal 70% a quasi l'80%.

In questi anni è profondamente mutato l'atteggiamento dei cittadini e consumatori verso l'attività di allevamento. In particolare c'è una maggiore sensibilità rispetto alle tematiche del benessere animale, dell'impatto ambientale, delle caratteristiche dei prodotti e delle informazioni fornite. Questa situazione e le particolari condizioni orografiche, economiche e socio-culturali italiane rendono impraticabili produzioni di massa, che facciano leva solamente su un ridotto costo di produzione.

Pertanto la differenziazione produttiva e la valorizzazione attraverso lo strumento della DOP è una scelta obbligata per assicurare competitività e sostenibilità nel medio e lungo periodo alla suinicoltura italiana.

Per fidelizzare il consumatore moderno che è attento ai valori di tradizione, legame col territorio, trasparenza e correttezza delle pratiche produttive e delle informazioni divulgate è necessario l'impegno consapevole di tutti gli operatori della filiera.

Le caratteristiche dei prosciutti DOP devono essere distinguibili da quelle di altre produzioni. Questo si ottiene solamente da materia prima derivata da suini con una specifica impronta genetica. I programmi di selezione nel mondo sono orientati verso la massimizzazione della produzione di carne magra. Si tratta di un indirizzo incompatibile con le finalità della produzione dei prosciutti DOP e per questo è necessaria un'attività di miglioramento genetico "*ad hoc*", come quella realizzata dal Libro genealogico italiano ed indicata dai Disciplinari dei prosciutti DOP.

La selezione italiana per il suino pesante è un patrimonio di conoscenze, pratiche e tecniche specifiche e costituisce un fattore fondamentale per qualificare oggettivamente l'origine dei prosciutti di Parma e San Daniele.

Fonti bibliografiche

Norme

1. Regolamento (CEE) N. 20181/91 del Consiglio del 14 luglio 1992 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari
2. Regolamento (CE) N. 1107/1996 della Commissione del 12 giugno 1996 relativo alla registrazione delle DOP Prosciutto di Parma e Prosciutto di San Daniele, ai sensi dell'art 17 del Reg. (CEE) N. 20181/91

3. Regolamento (CE) N. 560/2006 del Consiglio del 20 marzo 2006 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari
4. Regolamento (UE) N. 1151/2012 del Parlamento europeo e del Consiglio del 21 novembre 2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari
5. Regolamento (UE) N. 1308/2013 del Parlamento e del Consiglio del 17 dicembre 2013, recante organizzazione comune dei mercati agricoli (regolamento OCM prodotti agricoli)
6. Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta Prosciutto di Parma - Prov. Mipaaf 9 agosto 2012 GURI n. 200 del 28 agosto 2012
7. Disciplinare di produzione della denominazione di origine protetta Prosciutto di San Daniele - Prov. Mipaaf 21 marzo 2007 GURI n. 77 del 2 aprile 2007
8. Piano di controllo (PDC) Prosciutto di Parma, approvazione rev. 27 settembre 2012
9. Piano di controllo (PDC) Prosciutto di San Daniele, approvazione rev. 16 giugno 2016
10. Dispensa di aggiornamento e di approfondimento "Requisiti di conformità del tipo genetico impiegato per la riproduzione dei suini utilizzati nel circuito delle DOP" Servizi unificati IPQ - INEQ, 14 settembre 2006
11. Disciplinare del Libro genealogico e del Registro anagrafico della specie suina - DM 11781 del 20 maggio 2016 (ex DM 23113 del 28 luglio 2005)
12. Disciplinare per le prove in stazione della specie suina - DM 11781 del 20 maggio 2016 (ex DM 23113 del 28 luglio 2005)

Pubblicazioni scientifiche

13. Bosi P and Russo V 2004. The production of the heavy pig for high quality processed products. Italian Journal of Animal Science 3, 309-321.
14. Buttazzoni L, Gallo M, Baiocco C and Carchedi C 1993. La selezione per la qualità della carne suina destinata alla trasformazione. Rivista di Suinicoltura 34, 139-145
15. Fontanesi L, Schiavo G, Scotti E, Galimberti G, Calò DG, Samorè AB, Gallo M, Russo V and Buttazzoni L 2015. A retrospective analysis of allele frequency changes of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed. Journal of Animal Breeding and Genetics 132, 239-246.
16. Fontanesi L, Schiavo G, Galimberti G, Bovo S, Russo V, Gallo M and Buttazzoni L 2017a. A genome-wide association study for a proxy of intermuscular fat level in the Italian Large White breed identifies genomic regions affecting an important quality parameter for dry-cured hams. Animal Genetics 48, 459-465.
17. Fontanesi L, Schiavo G, Gallo M, Baiocco C, Galimberti G, Bovo S, Russo V and Buttazzoni L 2017b. Genome-wide association study for ham weight loss at first salting in Italian Large White pigs: towards the genetic dissection of a key trait for dry-cured ham production. Animal Genetics 48, 103-107.
18. Lonergan SM, Huff-Lonergan E, Rowe LJ, Kuhlert DL and Jungst SB 2001. Selection for lean growth efficiency in Duroc pigs influences pork quality. Journal of Animal Science 93, 2075-2085.
19. Russo V, Nanni Costa L, Lo Fiego DP and De Grossi A 1991. Early estimation of seasoning loss in Parma ham production. Proc. 37th Int. Congr. of Meat Science and Technology, pp 926-929. Kulmbach, Germany.
20. Schiavo G, Galimberti G, Calò DG, Samorè AB, Bertolini F, Russo V, Gallo M, Buttazzoni L and Fontanesi L 2016. Twenty years of artificial directional selection have shaped the genome of the Italian Large White pig breed. Animal Genetics 47, 181-191.

COMPETITIVITÀ DEGLI ALLEVAMENTI DA INGRASSI ITALIANI NEL CONTESTO INTERNAZIONALE

DE ROEST K., MONTANARI C.

Centro Ricerche Produzioni Animali - CRPA SpA, Reggio Emilia

INTRODUZIONE

La competitività delle aziende suinicole viene principalmente determinata dalla capacità del prezzo dei suini di coprire integralmente i costi di produzione. Le aziende suinicole italiane da ingrasso, specializzate nella produzione del suino pesante, si trovano ad operare in un contesto internazionale, dove prezzi dei tagli della carcassa determinano il prezzo finale del suino pesante. Questo significa che se il prezzo della coscia per le produzioni tipiche dipende molto dalle condizioni del mercato dei prosciutti a DOP, le quotazioni dei tagli di carne fresca sono invece fortemente legate alle dinamiche della domanda e dell'offerta sul mercato europeo e globale. Una analisi della competitività deve pertanto iniziare con un esame dello sviluppo del mercato internazionale della carne suina.

DINAMICA INTERNAZIONALE DEL MERCATO DELLE CARNE SUINE

Nel 2017 la produzione mondiale di carne suina ha raggiunto un nuovo record arrivando a 110 milioni di tonnellate. I primi tre produttori sono la Cina (53 milioni), l'Unione Europea (23 milioni) e gli Stati Uniti (12 milioni), seguiti da Brasile (3,7), Russia (3.0) e Vietnam (2,7). Solo 8 milioni di tonnellate della produzione mondiale (7,2%) entrano nel circuito del mercato internazionale. Esportatori netti sono in ordine di importanza l'Unione Europea, il Canada, gli Stati Uniti e il Brasile, mentre i paesi che importano quantità significative di carne suina sono il Giappone, il Messico, la Cina, la Russia e la Corea del Sud. In seguito all'embargo russo del 2015, l'export dell'UE si è indirizzato maggiormente verso mercati alternativi in Asia. Nel 2016 si è avuto un forte aumento della richiesta dalla Cina, con ripercussioni molto positive sulle quotazioni della carne suina sul mercato europeo e con benefici anche per i prezzi del suino pesante in Italia.

Su tutti i mercati asiatici (Cina, Giappone, Corea del Sud etc.) l'Unione Europea deve affrontare la concorrenza della carne suina americana e canadese, mentre l'export del Brasile trova principalmente collocamento sul mercato della Russia. La competitività della carne suina Europea viene giocata soprattutto sulla qualità determinata dal rispetto di elevate norme ambientali e di benessere animale, perché la leva dei costi di produzione viene utilizzata dagli Stati Uniti e dal Canada.

La produzione Europea di carne suina è cresciuta ininterrottamente nel periodo 2013-2016 (+5%) invece ha subito una lieve flessione (1%) nel 2017. La medesima dinamica si è avuta per l'export, europeo, con l'incremento della produzione collocato in buona parte sui mercati esteri, in particolare asiatici, che hanno ampiamente compensato la perdita sul mercato russo. Nel 2017, invece, l'export ha subito un calo dovuto ad una contrazione della domanda della Cina.

I prezzi europei per la carne suina sono stati fortemente sostenuti dal notevole incremento della domanda estera, specie nel periodo maggio 2016 - settembre 2017. Il calo successivo va invece attribuito alle minori opportunità di collocare il prodotto sui mercati internazionali.

Il prezzo del suino pesante in Italia ha sempre seguito una dinamica superiore ai prezzi registrati sulle più importanti piazze europee. Questo andamento è essenziale per poter coprire il più alto costo legato alla produzione del suino pesante. Tra il 2014 e il 2017 il divario del prezzo del suino pesante italiano rispetto alla media europea è aumentato dal 14% al 23%.

DINAMICA NAZIONALE DEL MERCATO DELLE CARNE SUINE

Il mercato italiano della carne suina è caratterizzato da un deficit produttivo pari al 48%. Buona parte della carne suina fresca e i tagli per la produzione di prosciutti non-DOP vengono importati dagli altri paesi dell'UE. Nel periodo 2013-2016 le macellazioni sono aumentate del 12%, ma la quota dei suini destinati al circuito DOP è calata dal 79% al 68%. Questo andamento va attribuito alla diminuzione del parco scrofe e alle maggiori importazioni dei suinetti, che alimentano la produzione di carne suina non-DOP. Nel medesimo periodo in Italia si è assistito ad un incremento della produzione, una riduzione dell'import e un rialzo dell'export di carne suina. L'incremento della produzione riguarda solo le macellazioni di suini non-DOP, perché il numero dei capi macellati nell'ambito del circuito DOP è rimasto costante intorno a 8 milioni. L'incremento della produzione è quindi legato al continuo aumento delle importazioni di magroni, che provengono prevalentemente dalla Danimarca.

Quasi il 60% delle importazioni di carne suina interessa le cosce che vengono destinate alla produzione del prosciutto cotto e al prosciutto crudo non-DOP. Nel 2016 si è registrato un calo pari al 3,9% e nei primi sei mesi del 2017 si segnala una ulteriore diminuzione del 4% dell'import delle cosce. È probabile che quest'ultimo sia compensato dalla maggiore produzione di cosce di suini ingrassati in Italia con magroni importati.

L'export di carne suina, salumi e grassi continua a crescere da anno in anno. Nel 2016 si è registrato un aumento del 7% e nei primi sei mesi del 2017 si registra un ulteriore progresso del 5,9%. I prodotti principali sono prosciutto crudo, mortadelle, prosciutto cotto e salami. La performance è il risultato della capacità dell'industria salumiera italiana di valorizzare sui mercati europei e extra-europei sia i suini pesanti nazionali che le carni suine di importazione.

In base ad una analisi di 15 allevamento da ingrasso di suini pesanti per il circuito DOP, il costo di produzione della carne suina in Italia è pari € 1,51/kg (IVA inclusa). Circa il 45% del costo è rappresentato dalla spesa per l'alimentazione, mentre l'acquisto del magrone di 33 kg incide per il 36%. Il costo di produzione della carne suina è basato su un allevamento medio di 6.200 posti da ingrasso che acquista magroni al peso di 33 kg e macella ad un peso vivo pari al 167 kg/capo. L'incremento medio giornaliero è di 677 g/capo/giorno e l'indice di conversione è pari a 3,46 kg di mangime per carne (resa mangime del 29%). Tenendo conto di un prezzo medio alla vendita di € 1,48/kg e del coefficiente di compensazione dell'IVA, nel 2016 l'allevamento medio da ingrasso ha realizzato un utile netto pari a € 0,08/kg.

In precedenza si è accennato all'import di magroni dalla Danimarca. L'incremento delle importazioni va attribuito al basso costo di acquisto rispetto al magrone italiano utilizzato per la produzione del suino pesante DOP. Nel 2016 il prezzo del magrone italiano è stato superiore del 63% rispetto al magrone danese e nel 2017 il divario è cresciuto fino all'87%. La differenza è ascrivibile allo scarto significativo nella produttività delle scrofaie italiane rispetto a quella danese. Se in Italia il numero di svezzati per scrofa nel 2016 è stato pari a 24, in Danimarca è stato di 32. In Germania, Francia e Olanda il numero di svezzati per scrofa è rispettivamente di 29, 30 e 28. La bassa produttività delle scrofe in Italia è legata ad un basso numero di parti per scrofa (2,22) e di nati vivi per parto (27), che solo parzialmente viene compensato da una più bassa mortalità pre-svezzamento (11,6%). Le differenze nella produttività delle scrofe si ripercuotono nei prezzi di vendita dei magroni e questo spiega l'interesse di alcuni allevatori italiani per l'acquisto di magroni danesi (e anche olandesi) che presentano anche performance di ingrasso superiori rispetto ai magroni italiani. La maggior parte di quelli danesi viene ingrassato fino a 160 e 170 kg per essere destinato alla produzione di salumi italiani non-DOP. Alimentano una domanda interna e

estera di salumi a più basso prezzo, ma con la qualità conferita dall'industria italiana.

La suinicoltura nazionale si divide in un circuito DOP basato sul rispetto di disciplinari di produzione per i prodotti tipici italiani, che nel 2016 ha raggiunto una buona redditività, e in una produzione di suini pesanti non-DOP basata sull'ingrasso di magroni non-DOP importati dall'estero, che gode anch'esso di una discreta redditività, visto che può contare su magroni a più basso costo, su un costo di alimentazione più contenuto e su prestazioni produttive elevate.

ATTI DEL XLIV MEETING ANNUALE

Montichiari (BS), 15-16 Marzo 2018

ESAME NECROSCOPICO: INTERPRETIAMO LA PATOLOGIA RESPIRATORIA

NECROPSY: UNDERSTANDING RESPIRATORY PATHOLOGY

SARLI G.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna

Parole chiave: suino, necropsia, polmonite, diffusione aerogena, diffusione ematogena.

Key words: swine, necropsy, pneumonia, aerogenous spread, hematogenous spread.

INTRODUZIONE

Oggi anche in medicina veterinaria le necropsie, come già da anni avviene in medicina umana, sono svolte prevalentemente in centri dove opera personale specializzato quali, in campo animale, le sezioni diagnostiche degli IZS o i servizi di anatomia patologica dei dipartimenti universitari, in cui sono disponibili strutture adeguate per le precauzioni da adottare nel corso dell'indagine, inclusa la disponibilità del necessario *know-how* per le opportune deduzioni nonché dei percorsi per i successivi approfondimenti di laboratorio, non solo di tipo istopatologico.

Il veterinario libero professionista percorre in genere 2 strade di impiego dell'indagine necroscopica per finalità diagnostiche.

1. Fare pervenire il soggetto o i soggetti presso un centro competente. In questo caso il limite maggiore che si pone è il trasporto di soggetti morti (soprattutto se animali a fine ciclo o riproduttori).
2. Prelevare in sede il campione da conferire. Questa che può sembrare la via più semplice invece riassume la criticità del prelievo che può non essere adeguato per le necessità diagnostiche. E' proprio in funzione di questa criticità che il prelievo, in azienda, di organi o loro parti non dovrebbe essere visto come un semplice passaggio di matrici verso i laboratori specialistici, ma come la continuazione di un percorso diagnostico che partendo dall'anamnesi e dalla sintomatologia va verso i laboratori specialistici passando proprio attraverso la necropsia che, quindi, è una tappa importante dell'iter diagnostico.

Tra i veterinari liberi professionisti, il suiatra è un professionista che ricorre spesso all'esame necroscopico per finalità diagnostiche. La necropsia è quindi, in suinocoltura, una tappa importante dell'iter diagnostico e va affrontata con un giusto equilibrio tra competenza e professionalità sia nella tecnica che nell'interpretazione. La competenza inizia con l'individuazione, tra più soggetti morti, di quelli da preferire per la necropsia: quelli in cui il processo patologico si consideri conclamato, quelli morti più di recente. La condizione migliore sarebbe quella di potere sopprimere animali con sintomatologia conclamata e procedere immediatamente con la necropsia.

Tecnica

Va tenuto presente uno strumentario minimo da avere sempre in dotazione rappresentato in forma essenziale da un coltello, un costotomo ed una sega, meglio se accompagnati da forbici, pinze chirurgiche, bisturi, specilli. E' importante avere in disponibilità un pennarello indelebile e contenitori (vasetti, sacchetti) e tamponi sterili per i prelievi con finalità diagnostiche dirette (virologiche, batteriologiche e parassitologiche) mentre, se si vuole procedere

con il prelievo per l'esame istologico si può scegliere se prelevare l'organo in toto o solo le parti interessate dal processo patologico. Si vedano in seguito le indicazioni per la fissazione. E' sempre necessario disporre di un contenitore refrigerato (da impiegare per collocare sia i campioni per la diagnosi diretta che i tessuti non fissati per l'esame istologico) da usare sempre, anche quando i tempi di consegna al laboratorio sono relativamente brevi (1-2 ore). Non è invece indispensabile tenere refrigerati i tessuti immersi in liquido fissativo (anche se la precauzione di non esporli a temperature estreme è sempre da osservare).

Scuoimento ed apertura delle cavità

Esistono diverse tecniche con posizionamento dell'animale prono e legato su un tavolo anatomico o appeso con entrambi gli arti posteriori che però non sono agevolmente utilizzabili in condizioni di campo. La condizione più favorevole, laddove non si dispone di tavoli anatomici attrezzati, è quella di seguire le indicazioni di Guillamon e Jalon ("Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina", <http://www.fondiz.it/pdf/56.pdf>).

Interpretazione

Può risultare dispersivo in questa sede affrontare la discussione sull'interpretazione di quadri anatomopatologici riscontrabili nei diversi sistemi ed organi, pertanto cercherò di focalizzare l'attenzione sulla patologia respiratoria che, insieme a quella gastroenterica, rappresenta la maggior parte dei quadri anatomopatologici osservabili nella specie.

Primo punto: cosa osservo?

Nel suino, quadri di patologia respiratoria possono essere ascritti a 3 evenienze: riniti, polmoniti, pleuriti, che possono presentarsi come eventi separati o in associazione. I patogeni responsabili di quadri patologici nelle vie respiratorie e nel polmone raggiungono le prime quasi esclusivamente per via aerogena (un esempio classico sono le riniti negli animali giovani e la ben nota rinite atrofica), mentre il polmone può essere raggiunto sia per via aerogena, come estensione da un primitivo interessamento delle vie aeree, ma anche per via ematogena. **Nel polmone, il coinvolgimento per via aerogena o ematogena condiziona quadri di patologia diversi per tipologia e per localizzazione.**

L'arrivo di patogeni per **via aerogena** induce quadri di polmonite localizzati nelle parti cranioventrali, di cui esempio tipico sono la polmonite enzootica, e le broncopolmoniti in genere. In questi casi si osservano quasi sempre i seguenti caratteri macroscopici:

- Variazione della consistenza (sembra di palpare del fegato = epatizzazione, nella fase acuta, mentre sembra di palpare del muscolo = carnificazione, nella fase cronica).
- Variazione del colore: rosso scuro tipicamente nelle aree epatizzate, mentre un colore più grigiastro/biancastro nelle forme croniche. La variazione cromatica può essere anche accentuata da edema infiammatorio (fasi acute) del connettivo perilobulare e da ispessimento fibroso (fasi croniche) dello stesso.
- Presenza di essudato nelle vie aeree, da catarrale scarso e denso (nella polmonite enzootica) a più abbondante e con carattere anche simile a pus nelle polmoniti enzootiche complicate o nelle broncopolmoniti.
- Ispessimento murale biancastro delle piccole vie aeree (c.d. polmonite a manicotto) tipica delle infezioni da *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Quindi, nelle **patologie polmonari infiammatorie aerogene**, i caratteri macroscopici salienti sono la localizzazione (cranioventrale) con variazione di consistenza (da epatizzazione a carnificazione), colore (da rosso a grigio-biancastro) e coinvolgimento delle vie aeree (bronchite catarrale o catarral-purulenta). Il **quadro macroscopico depone quindi per una broncopolmonite**. Gli agenti eziologici responsabili di questi processi patologici sono

ascrivibili a virus respiratori (es. SuHV-1, virus influenzali) o a *Mycoplasma hyopneumoniae* spesso con complicazioni batteriche secondarie, il tutto oggi indicato come *porcine respiratory diseases complex* (PRDC).

Si colloca in questo gruppo anche la pleuropolmonite da *A. pleuropneumoniae* ma con alcune differenze.

- I focolai (spesso anche solo uno) sono craniali ma non necessariamente ventrali.
- La consistenza è sempre "epatica" ma cronicizzando tendono ad evolvere in sequestri o in ascessi.
- Una pleurite fibrinosa focale sovrasta il focolaio di polmonite (la contemporanea presenza di un focolaio di consolidamento (epatizzazione) polmonare abbinata a pleurite fibrinosa della pleura che ricopre il focolaio di polmonite caratterizza macroscopicamente le polmoniti fibrinose).
- In sezione non si apprezza costantemente un coinvolgimento delle vie aeree, se non in casi complicati da altri batteri.

L'arrivo di patogeni per **via ematogena** comporta una localizzazione diversa del processo patologico: sono coinvolte prevalentemente le aree dorsali dei lobi basilari. Si possono verificare due evenienze.

- L'arrivo di tromboemboli settici partiti da processi settici localizzati altrove, che, laddove nel polmone si arresteranno, possono generare la formazione di ascessi (polmonite apostematosa embolica). Il carattere macroscopico saliente in questi casi è la presenza di uno o più ascessi localizzati nelle parti dorsali del polmone. Appartengono a questa tipologia di lesioni (multifocali e circoscritte) anche quelle granulomatose tubercolari che si manifestano con nodosità multiple prevalentemente dorsali.
- L'arrivo di agenti pneumotropi o endoteliotropi al polmone attraverso il circolo ematico, con genesi di una polmonite interstiziale (è questo il caso nelle polmoniti da PRRSV, da PCV2, nella migrazione massiva di ascaridi o delle setticemie da batteri gram negativi). I caratteri macroscopici in questi casi sono diversi da quelli delle forme aerogene.
 - L'aumento di consistenza è più contenuto; i termini che si usano per definirla sono "cotonoso" o "gommapiuma".
 - Moderato aumento di volume con impronte delle costole.
 - Il colore va dal rosso delle forme acute al pallido biancastro a margini sfumati delle forme croniche.
 - Le vie aeree non mostrano interessamento.

Nelle **patologie polmonari infiammatorie ematogene**, escludendo le polmoniti apostematose emboliche, i caratteri macroscopici salienti (lesione diffusa, prevalentemente localizzata nelle parti dorsali dei lobi basilari, moderato aumento di volume e consistenza "cotonosa" o "gommapiuma", colore più chiaro ed assenza di coinvolgimento delle vie aeree) depongono per una **polmonite interstiziale**.

Va ricordato che appartiene a questo gruppo di patologia (polmonite interstiziale) anche la lesione indotta dai virus influenzali (bronchiolite e alveolite acute necrotizzanti); in questo caso però, la patogenesi è aerogena e le lesioni sono prevalentemente cranioventrali. Inoltre non è facile osservare quadri caratterizzati dal solo contributo virale senza complicazione batterica secondaria, pertanto quello che nella maggior parte dei casi si osserva è una polmonite cranioventrale aerogena con i caratteri, già delineati, di broncopolmonite.

Ulteriore eccezione va menzionata per la patologia polmonare da strongili (*Metastrongylus*)

in cui le larve arrivano per via ematogena e linfogena, gli adulti si localizzeranno nei piccoli bronchi delle zone più aeree (quelle dorsali) del polmone causando una bronchite catarrale-purulenta a cui possono contribuire anche complicanze batteriche, che possono dare origine a focolai lobulari di broncopolmonite non localizzati però nelle parti cranioventrali (tipicamente vi sono focolai lobulari di broncopolmonite dorsali o sui margini dei lobi basilari). Le lesioni comunque sono più complesse poiché sostenute anche da flogosi interstiziale e granulomatosa verso i parassiti e sono associate a focolai di enfisema o di atelettasia a seconda che la presenza di essudato e parassiti nelle piccole vie aeree causi rispettivamente ostruzione o occlusione.

Le pleuriti possono essere associate a patologie polmonari (un classico esempio si ha nella pleuropolmonite da *A. pleuropneumoniae*), ma nel suino spesso la patologia flogistica pleurica (pleuriti acute sierofibrinose che cronicizzando diventano fibrose) può non concomitare con polmoniti, ma con altre sierositi (pericardite, peritonite) e artriti in quadri quindi di patologia sistemica e non confinata solo all'apparato respiratorio e sostenuti eziologicamente da *H. parasuis*, *S. suis*, *M. hyorinis*, *Actinobacillus spp.*

Secondo punto: come interpreto?

Patologie flogistiche polmonari a patogenesi aerogena hanno spesso solo nel polmone la manifestazione di patologia e il risentimento generale è condizionato dall'insufficienza respiratoria che ne consegue. Quindi in tali casi il prelievo del polmone (per indagini eziologiche o istologiche) rappresenta il target indispensabile e sufficiente.

Patologie flogistiche polmonari a patogenesi ematogena hanno nel polmone l'estensione di un processo localizzato in altri organi che, spesso, sono più indicati da prelevare per ottenere le indicazioni diagnostiche necessarie. In tali casi quindi l'attenzione va concentrata sul polmone ma anche su organi linfoidi (PCV2, PRRS), processi settici extrapolmonari a diversa localizzazione che, in aggiunta ai risultati ottenuti dal prelievo del polmone, hanno maggiore valenza nel fornire, soprattutto, le indicazioni eziologiche.

L'interpretazione quindi nel primo caso è: patologia confinata al polmone mentre nel secondo: coinvolgimento polmonare in corso di malattia sistemica.

Terzo punto: cosa e come devo prelevare?

La risposta al secondo quesito genera chiarezza su questo terzo punto. Nelle patologie a patogenesi aerogena il prelievo del polmone e dei linfonodi mediastinici rappresenta il target sufficiente, mentre nelle patologie polmonari a patogenesi ematogena il prelievo del polmone deve essere affiancato a quello di organi che sono i veri target che renderanno sufficiente il prelievo ai fini della diagnosi eziologica. In questi casi quindi il polmone è da vedere come un target non sempre sufficiente.

Una volta individuato cosa campionare si procederà con i prelievi per le diverse indagini da richiedere. In merito al prelievo per l'esame istologico, se non si decide di mandare tutto l'organo (refrigerato) al laboratorio competente, esso deve essere seguito da **rapida fissazione in adeguato liquido**. Il fissativo più usato in istologia è la formalina in soluzione d'uso al 4%, meglio se con aggiunta di tampone fosfato (c.d. formalina tamponata, disponibile in commercio). Va però ricordato che con il regolamento UE n.895 del 14/08/2014 e normative collegate la formalina da "cancerogeno presunto" è stato definito "cancerogeno certo" e, in Italia, dal 1/01/2016 la formalina è di fatto inclusa nell'elenco delle sostanze cancerogene, pertanto vi sono precauzioni nell'impiego che ne prevederebbero l'uso sempre sotto cappa aspirante. Quindi può risultare pericoloso, oltre che non consentito, disporre in campo di fissativi a base di formalina. Per ovviare questo inconveniente si possono usare fissativi a

base di alcool disponibili in commercio (Accustain della Sigma-Aldrich; Cell-Block della Bio-Optica) oppure semplicemente diluendo al 50%-70% l'alcool etilico del commercio.

Va però ricordato che fissativi diversi dalla formalina, seppure non modificano l'aspetto morfologico dei tessuti nel confronto con la formalina, possono modificare l'assetto antigenico dei tessuti o del loro contenuto inficiando altre indagini (per esempio l'immunoistochimica) che è spesso abbinata ad indagini istologiche per finalità sia diagnostiche che di ricerca. Pertanto è consigliabile interfacciarsi con il laboratorio per sapere quale fissativo usare e, nella necessità di dovere inviare materiale fresco, organizzarsi per refrigerarlo e consegnarlo nel più breve tempo possibile.

Se non si invia l'organo intero cosa bisogna prelevare? Per l'esame istologico le lesioni non vanno mai prelevate nelle parti centrali, poiché spesso racchiudono una lesione complicata o necrotica, mentre più indicative sono le parti periferiche della lesione, al limite con il parenchima circostante normale, che permettono di individuare il processo patologico al suo esordio (parte più periferica della lesione) e la sua evoluzione (progredendo nell'osservazione verso le parti più centrali). Quindi se le lesioni sono piccole (1-2 cm) si possono prelevare anche interamente, se sono più grandi è bene prelevare al margine con il tessuto circostante normale. La dimensione del tessuto prelevato è importante: i frammenti non dovrebbero essere spessi più di 1 cm per permettere una rapida fissazione del tessuto anche nelle parti profonde, che altrimenti risulterebbero tardivamente fissate e soggette a fenomeni autolitici che comunque si realizzano anche in caso di fissazione ritardata: pertanto **ricordare sempre di fissare subito e pezzi piccoli**. Una precauzione importante nel prelevare parti di polmone è quella di usare un coltello ben affilato. Infatti, la compressione eccessiva generata dall'uso di uno strumento non perfettamente funzionante può, in un organo pieno d'aria come il polmone, generare facilmente artefatti da prelievo.

Sicuramente le indicazioni eziologiche risultano prevalentemente dalle indagini dirette (batterologiche, virologiche, parassitologiche) ma non va sottovalutato il contributo che l'esame istologico può fornire anche in questo senso. Sono oggi comunemente applicate nei laboratori diagnostici indagini immunoistochimiche o di ibridazione *in situ* dove, con l'uso di anticorpi o di sonde specifiche per un determinato agente eziologico, se ne può mettere in evidenza la presenza nei tessuti e nelle lesioni. I vantaggi sono innumerevoli in quelle condizioni in cui la diagnosi di malattia (per esempio nelle *porcine circovirus diseases* -PCVDs, di cui un processo patologico noto è proprio il coinvolgimento di PCV2 nel *porcine respiratory disease complex*) prescinde dalla dimostrazione contestuale di processo patologico (polmonite interstiziale) e dell'agente eziologico (immunoistochimica o ibridazione *in situ* positiva rispettivamente per la presenza di proteine capsomeriche o di acido nucleico di PCV2).

BIBLIOGRAFIA

- Zimmerman JJ et al., Diseases of swine, Wiley-Blackwell, 10th Edition, 2012.
- Marcato PS, Patologia sistematica veterinaria, Edagricole, 2015

QUANTI SUINI DEVO ESAMINARE? IL CALCOLO DELLA NUMEROSITÀ DEL CAMPIONE E L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

FABIO OSTANELLO

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna

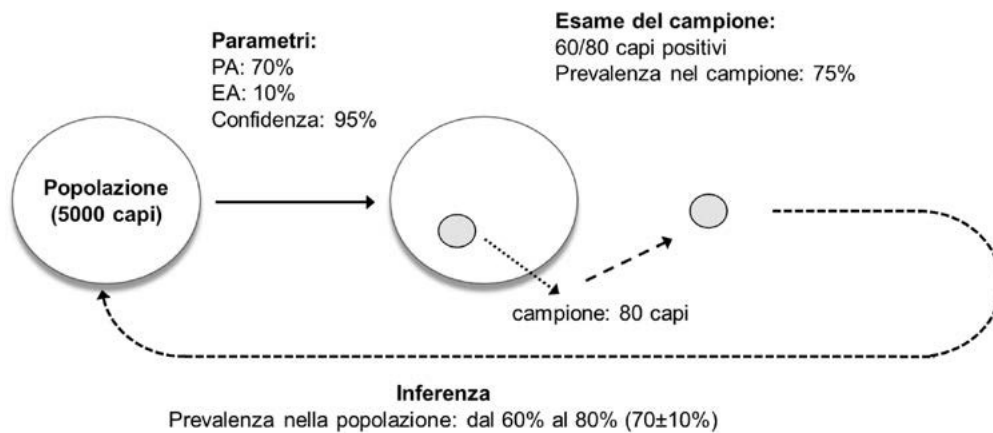
INTRODUZIONE

Quando si devono prelevare dei campioni, ad esempio per diagnosticare una specifica malattia, raramente è possibile esaminare *ogni singolo* componente della popolazione: i fattori limitanti più frequenti sono in genere rappresentati dalle risorse disponibili (economiche, di tempo, di personale, di strutture diagnostiche, ecc.). L'esame di un campione, cioè di un numero ridotto di animali, consente di superare la maggior parte di questi problemi. Un campione è quindi un sottoinsieme di elementi estratti da una popolazione di interesse. Ne consegue che un campione è soltanto una parte, più o meno grande, dell'intera popolazione. Scegliere, cioè estrarre, un campione da una popolazione significa effettuare un campionamento. Il principale obiettivo di una indagine condotta su base campionaria è quello di raccogliere dati e informazioni che consentiranno di generalizzare, con un certo grado di incertezza, all'intera popolazione, le conclusioni ottenute dall'esame del campione. Questo processo di generalizzazione è detto inferenza (figura 1).

Quando si effettua una valutazione su base campionaria, è necessario tener presente che non si otterranno mai dei risultati del tutto affidabili, cioè applicabili con certezza all'intera popolazione da cui è stato estratto il campione. Ciò significa che il processo di inferenza è soggetto ad errore. Per valutare l'affidabilità di uno studio campionario è indispensabile tener conto di vari fattori, fra i quali i più importanti sono: i criteri di scelta della popolazione in esame, la numerosità ed il metodo con cui è stato selezionato il campione, il periodo di osservazione, i metodi adottati per identificare i casi di malattia, le tecniche di analisi, la precisione delle misure effettuate. In questa sede valuteremo solo gli aspetti relativi al calcolo della numerosità del campione, con particolare riferimento alla diagnosi delle malattie trasmissibili.

Se siete interessati agli aspetti matematici del problema, esistono molti buoni libri di statistica o di epidemiologia che vi possono fornire esaurienti spiegazioni relativamente alle formule utilizzate per il calcolo (vedi Bibliografia). Il mio scopo è invece quello consentire a chiunque di stabilire, in modo corretto, il numero di soggetti che devono essere estratti da una popolazione ed esaminati in modo da eseguire una stima di tipo campionario e valutare in maniera congrua i risultati. Per fare questo, esistono numerosi strumenti informatici gratuiti che, con un minimo di conoscenze, ci permettono di effettuare i calcoli necessari.

Figura 1. Rappresentazione schematica del campionamento e del processo di inferenza



I LIMITI DEL CAMPIONAMENTO E IL CONCETTO DI RAPPRESENTATIVITÀ

Partiamo da una semplice osservazione: i dati che si ottengono da una indagine campionaria non saranno mai assolutamente precisi e non rispecchieranno mai la reale situazione sanitaria di un gruppo numeroso di soggetti. In altri termini, i dati che si ottengono sono una approssimazione (stima), più o meno valida, della realtà. E' chiaro però che questa approssimazione ha enormi vantaggi in termini economici, di tempo, ecc. Ne consegue che è possibile ottenere comunque delle informazioni anche in quelle condizioni in cui non è perseguibile la strada dell'esame di tutti gli animali. E' possibile inoltre stabilire a priori il livello di precisione desiderata tenendo però in considerazione il fatto che a maggiore precisione consegue la necessità di aumentare la numerosità del campione.

L'affidabilità delle conclusioni cui è possibile giungere attraverso indagini di tipo campionario dipende sostanzialmente da due elementi: il primo, quantitativo, è quello relativo al numero di soggetti che dovranno costituire il campione, cioè alla numerosità (dimensione) del campione e il secondo, qualitativo, è quello relativo alle caratteristiche che questi individui devono possedere per garantire la rappresentatività campionaria (es. composizione per sesso, età, peso, caratteristiche genetiche del campione).

Il numero di animali che compongono il campione è uno dei più importanti fattori che influiscono sulla precisione della stima: campioni di grandi dimensioni (rispetto al totale dei soggetti) permettono infatti stime più precise.

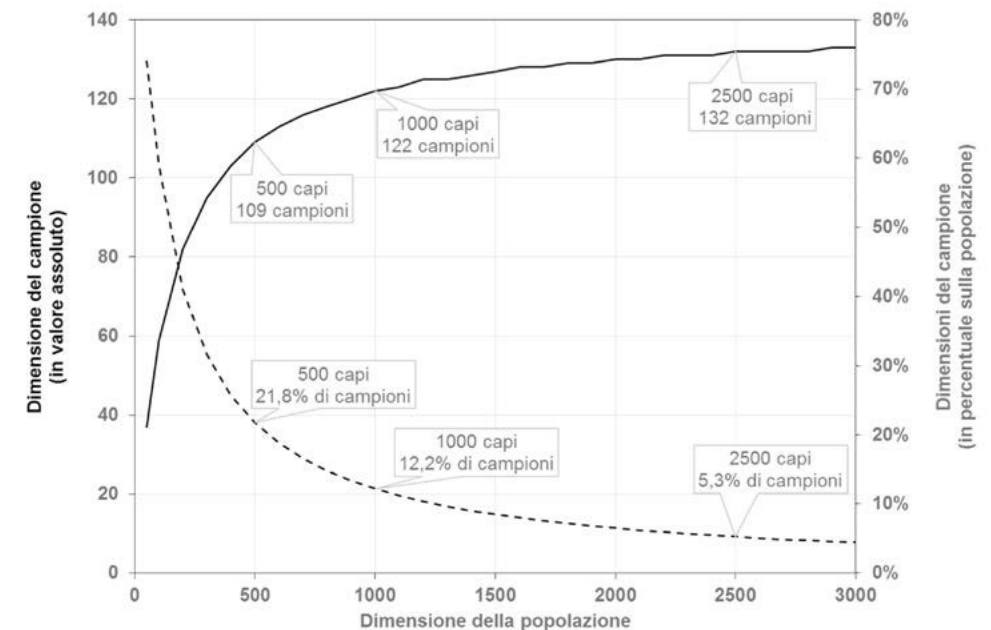
L'aspetto qualitativo viene garantito quando ciascun animale ha la stessa probabilità di entrare a far parte del campione. In tal caso il campione viene detto "randomizzato" o "casuale". Affidandosi al caso si ottiene, in una qualche misura, la garanzia che il campione sarà rappresentativo della popolazione stessa, ossia ne rifletterà le caratteristiche con una certa approssimazione. Tutto ciò vale però solo nell'ambito del campionamento di tipo probabilistico. Ci sono situazioni in cui può essere preferibile scegliere un'altra strada. Ad esempio, se la mia necessità è quella stabilire l'eventuale presenza di una malattia in allevamento, potrebbe essere opportuno selezionare solo gli animali con sintomi clinici. Questo tipo di campionamento, che viene definito "di convenienza", non permette però di generalizzare le osservazioni all'intera popolazione.

Ci sono altri 2 aspetti da tenere in considerazione: a) i vantaggi dell'esame campionario

crescono all'aumentare della dimensione di popolazione: per piccole popolazioni (50-100 capi) ha poco senso effettuare indagini campionarie; b) è concettualmente un grave errore stabilire un numero di campioni da esaminare sulla base di percentuali "fisse" che non tengono in considerazione il numero di animali che compongono la popolazione in esame.

Proviamo a spiegare questi ultimi aspetti con un esempio. In figura 2, la curva nera rappresenta il numero di campioni necessario a stimare la prevalenza di malattia (vedi dopo) in allevamento. E' evidente che all'aumentare del numero di animali presenti in allevamento aumenta (prima rapidamente, poi più lentamente) anche il valore assoluto dei campioni da prelevare (es. allevamento di 500 capi: 109 campioni; 2500 capi: 132 campioni). Se però, rapportiamo il numero dei campioni alla popolazione da cui saranno estratti, è possibile osservare un andamento inverso (curva tratteggiata). Quindi: a) il campionamento è tanto più conveniente quando più grande è il numero di animali presenti; b) stabilire, a priori, il numero di animali da esaminare sulla base di percentuali fisse è un grave errore. Se, ad esempio, avessi fissato arbitrariamente al 5% il numero di campioni da estrarre, in un allevamento di 500 capi avrei esaminato 40 animali (ottenendo così un campione numericamente non rappresentativo), mentre in un allevamento di 2500 capi avrei esaminato 200 suini (ottenendo così un campione numericamente rappresentativo ma inutilmente grande).

Figura 2. Variazione assoluta e percentuale della numerosità del campione al crescere delle dimensioni della popolazione (PA: 10%; EA: 5%; LC: 95%)



AMBITI DI APPLICAZIONE DEL CAMPIONAMENTO

Attraverso l'esame campionario, è possibile valutare 3 diverse condizioni:

1. stimare la presenza/assenza della caratteristica che stiamo cercando (es. malattia) all'interno di un gruppo di animali (a prescindere dal numero di soggetti interessati dalla malattia);
2. stimare la percentuale (cioè la prevalenza) di animali che hanno la caratteristica che stiamo cercando (es. anticorpi specifici nei confronti di PRRSV);
3. stimare il valore medio di un carattere qualitativo (misurabile) in un gruppo di soggetti (es. peso medio degli animali presenti).

Le prime 2 condizioni hanno un interesse prevalentemente diagnostico mentre la terza possibilità può essere utilizzata anche in altri ambiti. Vediamole in dettaglio.

1) *Stima della presenza/assenza della malattia.*

Questo tipo di campionamento può essere utilizzando quando lo scopo non è tanto quello di conoscere quale è la percentuale di animali malati all'interno del gruppo ma si vuole stabilire *se* una determinata malattia è presente, a prescindere dal numero di soggetti coinvolti. In questo caso, il risultato ultimo del campionamento è dicotomico: se individuo almeno 1 soggetto positivo, considero l'intero gruppo da cui proviene quel soggetto come positivo (malato, infetto, ecc.) viceversa, se non individuo nessun soggetto positivo, considero l'intero gruppo come negativo (sano, non infetto, ecc.). Cosa devo tenere in considerazione per calcolare il numero di campioni necessari per valutare l'eventuale presenza di una malattia? Solo 3 valori:

- a) il numero dei soggetti totali della popolazione. Questo è il parametro di più semplice impostazione: è sufficiente conoscere, anche in maniera approssimativa, quanti animali sono presenti in un determinato allevamento o in una certa categoria;
- b) la prevalenza attesa (PA) cioè la percentuale di soggetti che mi aspetto possano essere positivi. La necessità di questo valore è apparentemente paradossale: secondo logica, se il mio scopo è quello di *escludere* la presenza di una certa condizione (es. malattia) il valore di PA dovrebbe essere zero. Purtroppo, per ragioni strettamente matematiche, la formula di calcolo richiede un valore di PA che deve essere maggiore di zero. Vediamo come è possibile risolvere, da veterinari, questo paradosso: se parliamo di malattie trasmissibili, quando l'agente eziologico entra per la prima volta in una popolazione, infetta, nella fase iniziale, solo una piccola frazione di soggetti (ma comunque sempre un numero di soggetti superiore a zero). Col passare del tempo, il numero di soggetti infetti tenderà, almeno inizialmente, ad aumentare, stabilizzandosi in una fase successiva. Se il mio scopo è quello di escludere la presenza di una malattia estremamente contagiosa (es. influenza), posso partire dal presupposto che, quando presente in allevamento, il virus influenzale interessi una percentuale di animali (prevalenza) molto alta, ad esempio superiore al 60%. E' chiaro che c'è la possibilità che, se l'infezione è appena entrata in allevamento, la prevalenza possa essere inferiore al 60% ma questa situazione può essere considerata relativamente poco probabile se riferita alla totalità degli allevamenti suinicoli infetti. Al contrario, se sono interessato ad escludere la presenza di una malattia poco contagiosa, posso scegliere un valore di prevalenza attesa più basso;
- c) livello di confidenza (LC). Questo valore rappresenta il grado di "robustezza" della stima cioè l'affidabilità del risultato (vedi oltre). Tradizionalmente viene utilizzato un valore del 95% ma è possibile aumentarlo o diminuirlo. E' intuitivo però che la maggiore "affidabilità" della stima (es. LC 99%) si paga in termini di aumento del numero di soggetti da esaminare, a parità delle altre condizioni.

Questo tipo di campionamento può essere utilizzato anche per valutare se, in un determinato allevamento, la prevalenza di infezione è al di sopra o al di sotto di un valore fissato in maniera arbitraria (valore soglia). In questo modo posso classificare gli allevamenti in due categorie: allevamenti "problema" in cui la prevalenza è superiore ad una certa soglia ed allevamenti "virtuosi" in cui la prevalenza è al di sotto di una determinata soglia. E' il caso ad esempio del controllo sierologico per malattia di Aujeszky.

Facciamo qualche esempio e vediamo di interpretare i risultati:

- in un allevamento di 5000 capi, che non effettua la profilassi vaccinale nei confronti dei virus influenzali, voglio stabilire sierologicamente se c'è circolazione virale. Prudenzialmente, ipotizzo una prevalenza attesa del 20% (in realtà è noto che negli allevamenti infetti la prevalenza supera il 60%) e scelgo di utilizzare un livello di confidenza del 95%. Utilizzando uno dei software suggeriti alla fine di questo articolo, stabilisco che il numero di soggetti da esaminare (campione) è pari a 14. L'esito dell'esame sierologico mi informa che tutti i 14 campioni sono risultati sieronegativi. Posso concludere, con certezza, che l'infezione è assente? No, posso solo affermare che l'infezione, se presente, interessa meno del 20% degli animali, situazione che, come sappiamo, è poco probabile. Siamo quindi propensi a ritenere che la malattia non è presente in allevamento;
- per un allevamento da riproduzione di 1200 scrofe, i requisiti per l'ottenimento della qualifica di allevamento indenne da Malattia di Aujeszky prevedono il controllo di 59 capi (PA: 5%; LC: 95%). Questa numerosità campionaria garantisce una probabilità del 95% (livello di confidenza) di rilevare almeno 1 capo positivo alla ricerca di anticorpi anti gE quando la prevalenza aziendale supera la prevalenza del 5%. Per il mantenimento della qualifica, il valore di prevalenza attesa è del 10%: in questo caso il numero di campioni scende a 29. Se ritenessi necessario un risultato più affidabile, potrei calcolare il numero di soggetti da esaminare utilizzando un livello di confidenza più elevato (es. 99%). I soggetti da esaminare sarebbero 89 nel primo caso e 44 nel secondo: la maggiore affidabilità si paga in termini di aumento del numero di soggetti da esaminare.

2) *Stima della prevalenza*

In questo caso, lo scopo del campionamento è quello di stimare la percentuale di soggetti che presentano la caratteristica che sto cercando (es. anticorpi specifici verso un certo agente eziologico) all'interno di una popolazione (es. allevamento). Cosa devo tenere in considerazione per calcolare il numero di campioni da esaminare? solo 4 valori:

- a) il numero (anche approssimativo) dei soggetti totali della popolazione (vedi paragrafo precedente);
- b) la prevalenza attesa (PA) cioè la percentuale di soggetti che mi aspetto possano essere positivi. Anche in questo caso siamo di fronte ad un paradosso ma la soluzione può essere trovata seguendo le indicazioni fornite in precedenza o riferendosi a valutazioni precedenti. Solo nel caso in cui non sia possibile ipotizzare nessun valore di prevalenza attesa (es. malattia mai segnalata in precedenza) è possibile utilizzare il valore 50%;
- c) errore accettabile (EA). Rappresenta, in percentuale, il livello di precisione desiderata rispetto al valore della prevalenza attesa. Spieghiamolo con un esempio: gli exit poll elettorali. Il sondaggio elettorale effettuato all'uscita dal seggio permette di stimare in poche ore la percentuale (cioè la prevalenza) di elettori che hanno votato per il partito X. Questo consente di ottenere delle stime del risultato elettorale molti

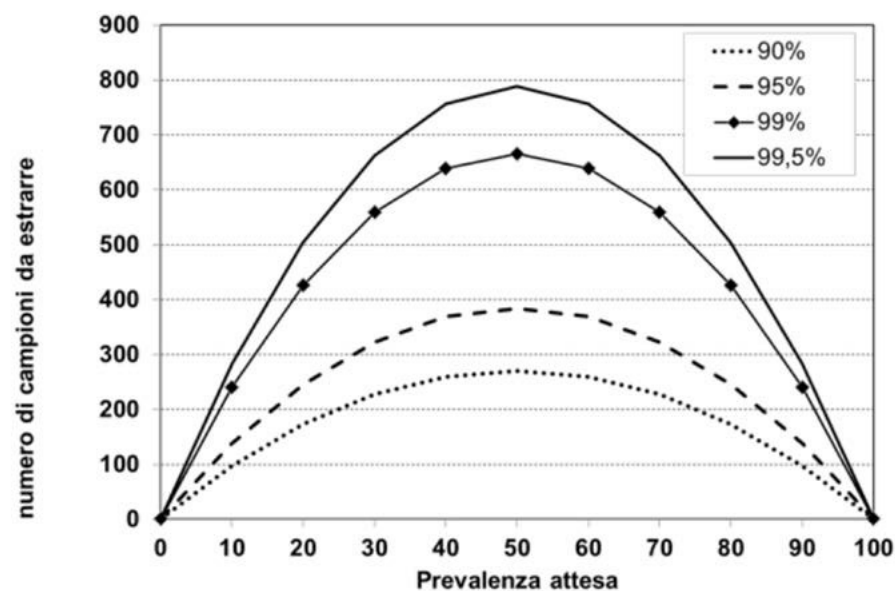
giorni prima della comunicazione dei risultati ufficiali. Il numero di soggetti da intervistare viene calcolato sulla base dei precedenti risultati elettorali del partito X (es. 22%) e di un certo valore di errore accettabile (es. 2%). Intervistiamo 1648 soggetti (0,006% di una popolazione di elettori pari a 30 milioni) e stabiliamo che il 21% degli intervistati ha votato per il partito X. Partendo dal presupposto che nessuno abbia mentito, è possibile concludere che, a livello nazionale, il partito X totalizzerà una percentuale di voti variabile da un minimo del 20% ad un massimo del 24% ($22 \pm 2\%$). Se volete, potete verificare i calcoli utilizzando uno dei software suggeriti alla fine di questo articolo.

d) Livello di confidenza (LC, vedi paragrafo precedente).

Facciamo qualche esempio e vediamo di interpretare i risultati:

- in un allevamento da ingrasso di 5000 capi, voglio stabilire la sieroprevalenza per PRRSV. Ipotizzo (in base alla mia esperienza o da dati di letteratura) un valore di prevalenza attesa del 70%, un errore accettabile del 10% e un livello di confidenza del 95%. Utilizzando uno dei software suggeriti alla fine di questo articolo, stabilisco che il numero di soggetti da esaminare (campione) è pari a 80 (che rappresenta l'1,6% degli animali presenti). L'esito dell'esame sierologico mi informa che 60 campioni sono risultati sieropositivi. La prevalenza nel campione è del 75%. La prevalenza nell'intera popolazione potrà variare da un minimo del 60% ad un massimo dell'80% ($75 \pm 10\%$), (figura 1);
- una malattia precedentemente mai segnalata si sta diffondendo nella popolazione. In questa situazione, non è possibile, realisticamente, stabilire un valore di prevalenza attesa. La soluzione da adottare è quella di utilizzare la prevalenza attesa che garantisca la massima numerosità del campione (figura 3). Questo *escamotage* da un lato mi mette al riparo da problemi legati alla rappresentatività numerica del campione ma dall'altro mi costringe ad aumentare le risorse da investire per la diagnosi.

Figura 3. Stima della prevalenza. Numero assoluto di campioni da estrarre al crescere della prevalenza attesa e per diversi livelli di confidenza



3) Stima del valore medio di un carattere qualitativo

In questo caso, sono interessato a conoscere qual è il valore medio di una variabile di tipo quantitativo (es. peso) in un gruppo di soggetti. Cosa devo tenere in considerazione per calcolare il numero di campioni da esaminare? Solo 3 valori:

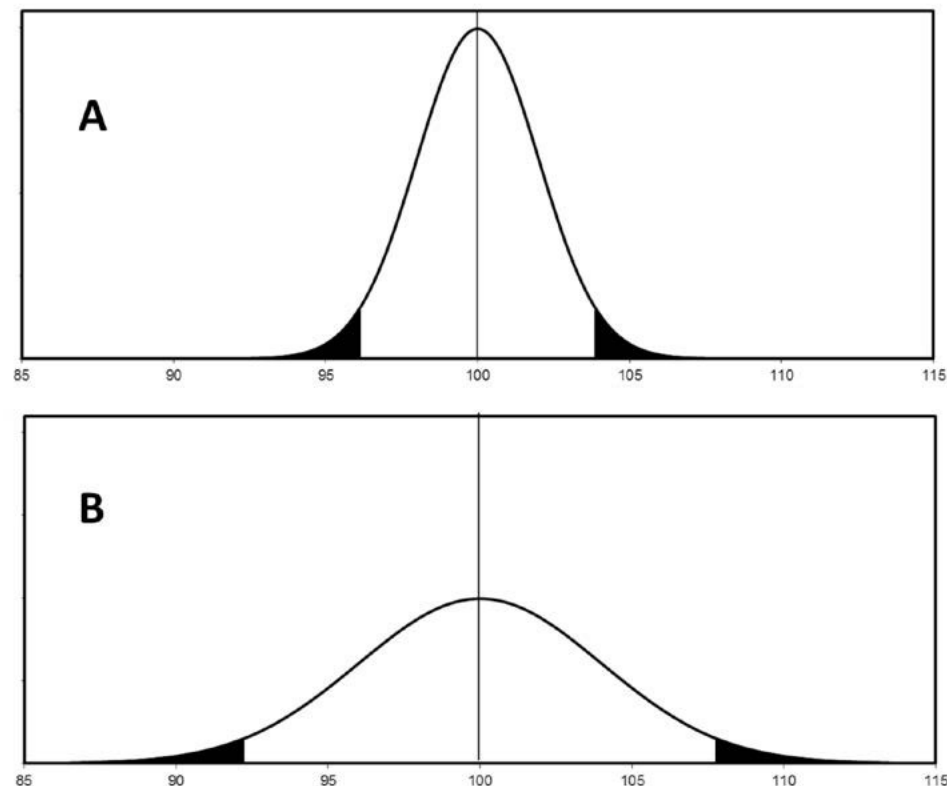
- il numero (anche approssimativo) dei soggetti totali della popolazione (vedi paragrafo precedente).
- la deviazione standard (DS). Proviamo a dare una spiegazione “grafica” del concetto di deviazione standard. La figura 4 rappresenta la curva di distribuzione Normale (o gaussiana). In questa distribuzione, il 95% delle osservazioni sono comprese nell'intervallo: media ± 2 DS. Immagina di aver pesato 2 gruppi diversi di suini (A e B) e di aver ottenuto, per entrambi i gruppi, lo stesso valore medio di peso vivo (100 Kg). Tuttavia: nel gruppo A il valore di Deviazione Standard è basso (2 Kg); la curva risulterà stretta e alta, in conseguenza dello scarso range di variabilità dei valori (96-103 Kg). Nel gruppo B il valore di Deviazione Standard è maggiore (4 Kg); la curva risulterà schiacciata, in conseguenza dell'ampio range di variabilità dei valori (92-108). In altri termini: nel gruppo A la popolazione è costituita da individui di peso relativamente omogeneo. In questa situazione, sarà sufficiente pesare pochi soggetti per ottenere una stima attendibile del peso vivo medio della popolazione. Nel gruppo B la popolazione è costituita da individui di peso poco omogeneo. In questa situazione, per ottenere una stima attendibile del peso vivo medio della popolazione sarà necessario pesare un numero maggiore di soggetti;
- Errore accettabile (EA). Rappresenta, nella stessa unità di misura del parametro che sto valutando (es. peso: Kg) livello di precisione desiderato.
- Livello di confidenza (LC, vedi paragrafo precedente).

Facciamo qualche esempio e vediamo di interpretare i risultati:

- vogliamo determinare con un errore accettabile di 2 Kg, il peso vivo medio di due lotti di suini (A e B) composto ciascuno da 300 animali. Il lotto A è composto da animali di peso omogeneo; in base ai risultati ottenuti da una serie limitata di pesate preliminari, mi aspetto che la deviazione standard della popolazione sia di 3 Kg. Il lotto B è composto da animali di “scarto” con peso non omogeneo; in base ai risultati ottenuti da una serie limitata di pesate preliminari, mi aspetto che la deviazione standard della popolazione sia di 10 Kg. Utilizzando uno dei software suggeriti alla fine di questo articolo, stabilisco che il numero di soggetti da pesare (campione) è pari a 9 (3% dei suini) per il lotto A mentre, per il lotto B sarà pari a 73 (24% dei suini).

Figura 4. Distribuzione del peso vivo di 2 gruppi di suini:

- A) peso vivo medio: 100 Kg; DS: 2 Kg; il 95% dei soggetti è compreso nell'intervallo di peso: 96-103 Kg
- B) peso vivo medio: 100 Kg; DS: 4 Kg; il 95% dei soggetti è compreso nell'intervallo di peso: 92-108 Kg;



BIBLIOGRAFIA

1. Bottarelli E., Ostanello F. Epidemiologia. Teoria ed esempi di medicina veterinaria, Edagricole, Milano, 2011.
2. Thrusfield M. Veterinary epidemiology, 3rd ed. Blackwell Science Ltd, Oxford, 2007
3. Cannon R.M., Roe R.T. Livestock Disease Surveys: a Field Manual for Veterinarians. Australian Government Publishing Service, Canberra, 1982.

Siti con software gratuiti per la stima della dimensione campionaria

1. <http://epitools.ausvet.com.au/content.php?page=SampleSize> (in inglese)
2. <http://www.winepi.net/uk/index.htm> (in inglese)
3. <http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/campion/dimens.xls> (in italiano, foglio Excel per il calcolo della numerosità del campione necessaria stimare la prevalenza di una malattia)
4. <http://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/campion/cannon.xls> (in italiano, foglio Excel per il calcolo della numerosità del campione necessaria e stimare la presenza di una malattia)

LA VITA QUOTIDIANA DI UN VETERINARIO SUIATRA IN DANIMARCA-COME LAVORIAMO

DR. BONNIE EDAHL HOELSTAD

DVM, Specialized in Swine Health, Hyovet, Denmark

www.hyovet.dk / bhoelstad@hyovet.dk

In Danimarca le scrofe sono circa un milione e la dimensione media degli allevamenti è di circa 1.000 scrofe. Un centinaio di veterinari specializzati nell'ambito suinicolo offrono consulenza agli allevatori in merito all'ottimizzazione della produzione e allo stato sanitario degli allevamenti.

I veterinari fanno parte di associazioni private. Hyovet è un'associazione di veterinari specializzati, che copre circa il 15% della popolazione suina danese. In tutto, sette veterinari lavorano solo per gli allevamenti e tutti i veterinari visitano i diversi allevamenti ogni giorno. Secondo la legislazione danese, gli allevamenti devono subire almeno una visita veterinaria al mese. I punti chiave di una visita potrebbero essere definiti come consulenze sui sistemi di produzione, gestione delle malattie, strategie di alimentazione e sul confronto con gli standard produttivi. I dati e le osservazioni raccolti nella visita vengono riassunti nel rapporto di visita, che viene poi inviato all'allevatore.

Circa il 75% di tutte le scrofaie danesi sono membri di un sistema di controllo sanitario denominato SPF - *specific pathogen free*. Le visite alle aziende vengono effettuate in base allo stato sanitario, in modo che allevamenti con lo stato più elevato vengano visitate come prime al mattino.

L'uso di antibiotici nella produzione suinicola danese è controllato dal sistema "cartellino giallo". Se un allevamento supera il limite, viene multato dal Governo e deve subire il doppio delle visite veterinarie ufficiali di controllo per i due anni successivi.

Tutte le prescrizioni di farmaci sono registrate in un sistema chiamato "Vetstat". Tutti i farmaci - antibiotici e vaccini - sono prescritti dai veterinari e consegnati dalla farmacia. I veterinari danesi non guadagnano soldi prescrivendo farmaci. Veterinari e produttori suinicoli sono controllati dalla *Danish Veterinary and Food Administration*. Lo scopo del controllo è quello di garantire un adeguato benessere degli animali e un elevato standard nell'ambito della sicurezza alimentare.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

CONSUMO ANTIMICROBICO, LESIONI AL MACELLO E BENESSERE ANIMALE: RELAZIONI NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI DA INGRASSO

ANTIMICROBIAL CONSUMPTION, LESIONS AT SLAUGHTERHOUSE AND ANIMAL WELFARE: RELATIONSHIPS IN INTENSIVE FATTENING PIG'S FARM

MAISANO A.M.^{1,2}, SANTUCCI G.¹, GHIDINI S.³, SCALI F.¹, COSTA A.⁴, BALLISTA C.⁴, ZAGHINI L.⁴, ATTANASIO G.⁴, BELLUZZI G.³, BORRELLO S.⁵, CANDELA L.⁵, COLAGIORGI A.³, GIACOMINI E.¹, GIUDICI F.¹, IANIERI A.³, LAZZARO M.¹, FRAZZI P.⁶, VITALI A.⁶, VEZZOLI F.², ZANARDI E.³, ALBORALI G.L.¹

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia*

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi*

³*Università degli Studi di Parma - Dipartimento di scienza degli alimenti e del farmaco*

⁴*Azienda Territoriale Sanitaria della Val Padana*

⁵*Ministero della Salute*

⁶*Unità Organizzativa Veterinaria, Regione Lombardia*

Parole chiave: consumo antimicrobici, benessere animale, macello

Key words: antimicrobial usage, animal welfare, slaughterhouse

Riassunto: L'uso di antimicrobici nel suino rappresenta un rischio sanitario per la diffusione dell'antibiotico-resistenza. Parametri importanti, quali benessere animale e lesioni al macello, potrebbero fornire dati utili ai fini di razionalizzare i trattamenti. Lo scopo di questo studio è stato esaminare le relazioni tra uso di antimicrobici, lesioni al macello e benessere.

Sono stati analizzati consumo di antimicrobici, benessere animale ed ispezioni al macello di 13 aziende da ingrasso. L'uso di antimicrobici è stato misurato nel 2016, come giorni di trattamento per suino allevato (giorni/suino). Il benessere è stato rilevato, tramite una selezione di *animal based measures* (ABMs), su 2336 suini (media 172±14). Le lesioni al macello su 67721 soggetti (media 5074±1701).

La mediana di consumo degli antimicrobici è stata 21 giorni/suino (*range* 0,1-87,8); le ABMs più frequenti sono state imbrattamento fecale di grado 2 (media 23,3±32,0%) e 1 (media 15,0±10,7%); le lesioni al macello: pleuriti (media 16,3±6,1%) e polmoniti (media 14,4±3,5%). Non vi sono correlazioni tra consumo di antimicrobici, ABMs e le lesioni al macello.

Sebbene i risultati di questo studio siano preliminari, l'assenza di correlazioni tra i parametri analizzati potrebbe implicare trattamenti non sempre razionali. L'ottimizzazione dei protocolli terapeutici dovrebbe prevedere un approccio integrato con i principali aspetti dell'allevamento (diagnostica, biosicurezza, consumo antimicrobici, benessere, ispezioni al macello).

Abstract: Antimicrobial usage (AMU) in pig farms pose a threat to public health due to the negative consequences on spread of antimicrobial resistance. Important factors, such as animal welfare and slaughterhouse records, may provide useful data regarding rational use of antimicrobials.

AMU, animal welfare, and slaughterhouse inspection of 13 fattening units were investigated. AMU was collected retrospectively for 2016 and calculated as mean days of treatment per reared pig (days/pig). Welfare was analysed, using a selection of animal based measures (ABMs), on 2336 pigs (mean 172±14). Slaughterhouse records (FSIS/FSA/WQ standards) of 67721 pigs

(mean 5074±1701) were also collected. Median AMU was 21 days/pig (range 0.1-87.8); the two most frequent AMBs were manure on the body score 2 (mean 23.3±32.0%) and 1 (mean 15.0±10.7%); the two most frequent slaughterhouse records were pleurisy (mean 16.3±6.1%) and pneumonia (mean 14.4±3.5%). No correlations were observed among AMU, animal welfare, and slaughterhouse records. Although results of this study are still preliminary, lack of correlations among AMU and the other factors may suggest that treatments were not always rational. In order to optimise AMU an integrated approach should be encompassed, which includes monitoring and reviewing: diagnostic protocols, biosecurity, animal welfare, and slaughterhouse protocols.

INTRODUZIONE

Il consumo di antimicrobici nel settore suinicolo rappresenta una seria fonte di preoccupazione sia per la sanità umana che per quella animale, soprattutto considerando la repentina diffusione dell'antibiotico-resistenza (AMR) che ha caratterizzato l'ultima decade (Garcia-Migura *et al.* 2014). Tali consumi, tuttavia, difficilmente potranno essere ridotti senza l'ausilio di sistemi di monitoraggio efficaci (Harbarth *et al.* 2015). Le conseguenze dell'uso di antimicrobici in allevamento non sono limitate al rischio d'incremento dell'AMR ma dovrebbero influenzare anche altri parametri quali il benessere animale, la frequenza e la gravità delle lesioni al macello. L'analisi di questi parametri, pertanto, potrebbe fornire delle utili informazioni per il monitoraggio dell'appropriatezza dei protocolli terapeutici e sull'uso razionale del farmaco.

I sistemi di monitoraggio della condizione degli animali al macello non sono ben codificati a livello nazionale; tuttavia sono disponibili degli schemi di classificazione utilizzati a livello internazionale, come ad esempio quelli proposti dal Food Safety and Inspection Service (FSIS) e dal Food Standards Agency (FSA); inoltre anche il protocollo del Welfare Quality® prevede una serie di rilievi al macello al fine di valutare il benessere animale (WQ 2009).

Per quanto riguarda il benessere animale, in Italia l'attuale normativa considera solamente le misure ambientali senza ponderare osservazioni dirette sull'animale quali, ad esempio, le *animal based measures* (ABMs) indicate dal protocollo Welfare Quality® (WQ 2009). Tali osservazioni, tuttavia, rappresentano diretta espressione dell'adattamento dell'animale all'ambiente in cui vive (WQ 2009) e dovrebbero essere parte integrante della valutazione del benessere animale. Lavori precedenti e recenti pareri dell'European Food Safety Authority (EFSA) raccomandano l'utilizzo di una selezione di ABMs, prioritari per la valutazione del benessere; nel caso dei suini all'ingrasso, esse sono: segni di malattia, lesioni cutanee, lesioni all'orecchio, lesioni alla coda, comportamento esplorativo e termoregolazione (EFSA 2012b). Altri Autori hanno evidenziato prevalenze rilevanti di alcune ABMs non presenti nella selezione EFSA ma particolarmente influenzate dalla conformità delle strutture, quali: bursiti, l'imbrattamento fecale, le zoppie e la presenza di animali sottopeso (Maisano *et al.* 2015).

Questo lavoro, svolto nell'ambito di un progetto di ricerca "Classyfarm" e finanziato dal Ministero della Salute, ha avuto come obiettivo quello analizzare la presenza o meno di relazioni tra consumo di antimicrobici, lesioni al macello ed ABMs in allevamento, nell'ottica di un approccio integrato alla razionalizzazione dell'uso di antimicrobici.

MATERIALI E METODI

Campione

Lo studio è stato svolto su 13 allevamenti, situati in Regione Lombardia. Tra febbraio e

marzo 2017 sono stati svolti sopralluoghi per la raccolta delle informazioni su benessere animale e consumo di antimicrobici. Le partite di suini incluse nelle valutazioni al macello afferivano tutte alla stessa struttura, a carattere industriale con la macellazione di circa 380 suini/ora.

Consumo degli antimicrobici

I dati di consumo degli antimicrobici sono stati raccolti retrospettivamente per l'anno 2016 mediante consultazione dei documenti cartacei (registri, bolle e ricette). Il consumo è stato stimato come giorni di trattamento per animale allevato, abbreviato in giorni/suino, utilizzando le "*defined daily dose animal for Italy*" (DDDAit) ed un peso standard al trattamento pari a 100 Kg. L'impiego di antimicrobici in categorie diverse dai suini grassi, anche se presenti in azienda, non è stato riportato nel presente lavoro.

Benessere in allevamento

Le rilevazioni sul benessere animale dei suini all'ingrasso sono state effettuate utilizzando la check-list elaborata dal Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale (CReNBA) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) che comprende anche le ABMs più rilevanti, secondo quanto indicato in letteratura. In tab. 1 sono riportate le ABMs rilevate e le relative descrizioni. Per ciascuna azienda sono stati esaminati almeno 150 soggetti.

Rilevazioni al macello

Le rilevazioni al macello sono state raccolte sulle partite inviate tra ottobre 2016 e giugno 2017. Al macello, durante l'ispezione post-mortem, sono stati valutati 53 tipologie di lesioni secondo le classificazioni degli schemi FSIS (FSIS, 2015) e FSA. Dieci tra le lesioni più frequenti e rilevanti per la sanità animale sono state selezionate per il confronto con il consumo del farmaco (vedi tab. 2). Le lesioni particolarmente pertinenti alla valutazione del benessere, inoltre, sono state raggruppate nelle quattro categorie (polmonite, pleurite, pericardite, *white spot*) secondo quanto previsto dal Welfare Quality® (WQ 2009).

Analisi statistica

Le informazioni riguardanti benessere animale, consumo di antimicrobici e lesioni al macello sono state inserite e processate attraverso il sistema di monitoraggio integrato Classyfarm (ex BioFaBenMa). Le correlazioni tra i consumi di farmaco, benessere e lesioni al macello sono state indagate secondo il coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman. Tutte le analisi statistiche sono state svolte utilizzando il GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

RISULTATI

I consumi mediani di antimicrobici sono risultati, per il 2016, 21 giorni/suino (*range* 0,1-87,8).

Le ABMs sono state rilevate su un totale di 2336 suini (media per azienda 172±14); in tab. 2 sono riportati i valori stratificati per allevamento abbinati ai rispettivi consumi di antimicrobici ed alla classificazione WQ delle lesioni al macello.

Le lesioni al macello sono state registrate su un totale di 67721 suini (media per azienda 5074±1701) e nel graf. 1 sono riportate le medie con le deviazioni standard delle osservazioni; in tab. 3 sono riportati i valori stratificati per allevamento abbinati ai rispettivi consumi di antimicrobici.

Non vi è stata alcuna correlazione significativa tra consumi di antimicrobici, benessere e lesioni al macello.

DISCUSSIONE

Consumo degli antimicrobici

Il consumo mediano di antimicrobici nelle 13 aziende incluse nello studio è stato pari a 21 giorni/suini ed è stato caratterizzato da un'ampia variabilità (vedi tab. 2) con *range* che sono andati da un minimo di 0,1 giorni di trattamento, per ciascun suino allevato nel 2016, fino ad un massimo di 87,8 giorni/suino. Dalle analisi statistiche non è emersa alcuna correlazione tra il consumo degli antibiotici e gli altri parametri selezionati, né per il benessere animale né per le osservazioni al macello. Questo risultato non è di facile interpretazione, tuttavia, esso potrebbe essere conseguenza di un uso non sempre razionale degli antimicrobici e/o di fallimenti, anche parziali, del trattamento terapeutico.

Il presente studio è stato realizzato su un piccolo gruppo di aziende e risultati più robusti saranno possibili solo su un campione notevolmente più ampio di allevamenti, tuttavia, l'elevato numero di carcasse considerate può fornire un utile strumento addizionale per valutare il corretto impiego degli antimicrobici nelle aziende prese in esame. Verosimilmente in alcuni di questi allevamenti non sono sempre attuate le buone pratiche per l'individuazione delle problematiche sanitarie sugli animali, pertanto, con l'ausilio di approfondite analisi dovrebbe essere possibile migliorare le misure atte a limitare la diffusione e prevenire la ricomparsa dell'infezione (Linee guida CE C299/04).

Benessere animale

Le ABMs rilevate in allevamento, così come quelle derivate dalle osservazioni al macello (vedi raggruppamento WQ tab. 2), hanno mostrato un'ampia variabilità del riscontro delle osservazioni. Tale varianza si è riscontrata sia per quanto riguarda ABMs tendenzialmente più legate allo stato sanitario, come sintomatologie enteriche lievi (*range* 0,0-39,3%) e respiratorie (*range* 0,0-9,1%), che per ABMs fattori di rischio per lo sviluppo di patologie, come l'imbrattamento fecale del corpo di grado 1 (*range* 2,6-34,6%) e 2 (*range* 0,0-85,4%). La presenza di un elevato grado d'imbrattamento cutaneo, infatti, predispone gli animali a sviluppare forme enteriche con maggior frequenza (EFSA 2005).

Altri risultati interessanti, per frequenza e distribuzione, hanno riguardato lesioni cutanee lievi (*range* 2,5-14%) e bursiti lievi (*range* 0,5-9,7%) che possono, a loro volta, facilitare l'ingresso di agenti patogeni. Altre ABMs come zoppie e morsicature alla coda sono state rilevate poco frequentemente e solo in alcuni allevamenti, tuttavia, la limitata numerosità campionaria non ha permesso di effettuare valutazioni generali sulla prevalenza o su eventuali correlazioni con i consumi di antimicrobici.

Rilevazioni al macello

Le osservazioni al macello sono state eseguite su un numero elevato di suini, quasi 70000 soggetti, corrispondente ad oltre il 50% della produzione totale delle aziende campionate. La frequenza di distribuzione di tali osservazioni, come per il consumo di antimicrobici e il benessere, ha mostrato dei *range* notevolmente variabili (vedi tab. 3). La reale variabilità delle lesioni al macello, inoltre, potrebbe essere ancora più ampia ed essere influenzata da numerosi fattori (anche geo-climatici) e metodi di rilevazione; ad esempio, un recente studio, condotto con due veterinari dedicati al solo rilievo delle patologie pleuro-polmonari, ha riscontrato valori più elevati di forme respiratorie: 46,4% di sola polmonite enzoootica e 47,5% di pleurite cronica (Merialdi *et al.* 2012), mentre un altro studio (Maisano *et al.* 2015) ha riportato delle prevalenze di polmonite (17,09%) paragonabili alle medie di questo studio, derivate dalla somma della polmonite sia enzoootica (9,3±3,5%) che non (5,1±1,2%).

Nel presente lavoro, rispetto a quanto osservato in una ricerca precedente (Maisano *et al.* 2015), si è registrata una prevalenza media lievemente inferiore per: pleuriti (16,3% vs 25,39%), pericarditi (1,5% vs 4,25%), *white spots* (10,5% vs 25,39%), ascessi (0,8% vs 1,62%) e ferite/traumi della cute (0,8% vs 2,64). La prevalenza di *white spots* in una percentuale comunque così rilevante è lo specchio di una problematica considerevole sia dal punto di vista sanitario che economico (Boes *et al.* 2010).

La scarsa frequenza (< 0,05%) con cui sono state identificate le dermatiti parassitarie è da considerarsi un risultato positivo, anche perché il macello rappresenta il miglior punto di osservazione per questo tipo di lesioni (Galuppi *et al.* 2007; Maisano *et al.* 2015).

L'apparente assenza di relazioni tra disordini respiratori rilevati in azienda e lesioni pleuro-polmonari al macello può essere spiegata sia dalle ridotte dimensioni del campione di allevamenti sia dalla natura delle ABMs, che forniscono "un'istantanea" dello stato di benessere dei suini al momento della visita.

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo lavoro dovranno essere confermati su un numero più ampio di aziende, tuttavia, l'assenza di correlazione tra i parametri registrati al macello, gli ABMs ed il consumo di antimicrobici, suggerisce la possibilità che i trattamenti effettuati sugli animali possano essere stati non sempre razionali.

L'impiego di antimicrobici deve essere guidato sia da un'oculata diagnosi clinica che da un rigoroso protocollo diagnostico; così da poter gestire razionalmente l'impiego del farmaco (scelta del principio attivo, vie di somministrazione, posologia).

Un sistema di monitoraggio che fornisca informazioni integrate su benessere, biosicurezza, consumo di antimicrobici e ispezioni al macello potrebbe rappresentare uno strumento fondamentale per coadiuvare azioni atte ad ottimizzare l'efficacia degli interventi terapeutici, l'appropriatezza dei protocolli diagnostici e le scelte gestionali; con riflessi positivi sulla sanità, la produzione e la riduzione della diffusione dell'AMR.

BIBLIOGRAFIA

- Boes J., A. Kanora, K.T. Havn, S. Christiansen, K. Vestergaard-Nielsen, Jos Jacobs, L. Alban. (2010) "Effect of *Ascaris suum* infection on performance of fattening pigs." *Veterinary Parasitology* 172 269-276.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2005) "Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types". *EFSA Journal*. 268, 1-19.
- EFSA (European Food Safety Authority) (2012b) "Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on the use of animal-based measures to assess welfare in Pigs". *EFSA Journal*. 10(1), 2512.
- FSIS (Focus Food Safety and Inspection Service) (2015). "Multi-species Disposition Basics with a Public Health". Available at https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/6ca9b2dc-2d3d-4b2f-b590-9ab7d3a313ec/PHVt-Multi_Species_Disposition.pdf?MOD=AJPERES
- Galuppi R., Avenoso A.M., Leotti, G., Ostanello, F., Poglayen, G. and Tampieri, M.P. (2007). "Diagnosis of sarcoptic Mange in Slaughtered Swine" *Veterinary Research Communications*, 31 (Suppl.1) 233-236.
- Garcia-Migura L., Hendriksen R.S., Fraile L. and Aarestrup F.M., (2014). "Antimicrobial

- resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine". Veterinary Microbiology, 170 (1-2), 1-9.
- Harbarth S., Balkhy H.H., Goossens H., Jarlier V., Kluytmans J., Laxminarayan R., Saam M., Van Belkum A. and Pittet D. (2015). "Antimicrobial resistance: one world, one fight! Antimicrobial Resistance and Infection Control". Antimicrob Resist Infect Control, 4,49
 - Linee guida CE C299/04 (2015). "Linee guida sull'uso prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria". Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea C 299/04 del 11/09/2015.
 - Maisano A. M., Luini M., Attanasio G., Vezzoli F. (2015). "Il benessere animale del suino grasso italiano in allevamento: valutazione al macello". Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini XLI Meeting Annuale, Montichiari (BS), 19-20 marzo 2015, 85-94.
 - Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. (2012) "Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors" The Veterinary Journal, 193, 234-239.
 - WQ (Welfare Quality® Protocol) (2009) "Welfare Quality® Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs)". Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.
Available at <http://www.welfarequalitynetwork.net/downloadattachment/45627/21651/Pig%20Protocol.pdf>

Tab. 1 - Osservazioni ABMs eseguite in allevamento e rilevazioni al macello (raggruppamento secondo il WQ).

Tab. 1 - Description of ABMs at farm and slaughterhouse records (WQ grouping).

ABMs	DESCRIZIONE
<i>Body Condition Score - Animale sottopeso¹</i>	Animali con prominenze ossee della spina dorsale, anche e ileo visibili
<i>Bursite lieve¹</i>	Presenza di una singola bursite >2-5 cm o piccole (1,5-2 cm) bursiti multiple sullo stesso arto
<i>Bursite grave¹</i>	Singola bursite molto grande >5-7 cm, qualsiasi bursite erosa o bursiti multiple tra >2-5cm
<i>Imbrattamento fecale 1¹</i>	Superficie cutanea interessata 20-50%
<i>Imbrattamento fecale 2¹</i>	Superficie cutanea interessata >50%
<i>Lesione corpo* lieve¹</i>	Da 5-10 lesioni su una o più regioni del corpo e/o a massimo da 11 a 15 lesioni su una sola regione del corpo
<i>Lesione corpo* grave¹</i>	Da 11 a 15 lesioni su 2 o più regioni del corpo o >15 lesioni su una sola regione del corpo
* Lesioni corpo: 1 lesione = 1 ferita <2cm o un graffio >2cm o 2 graffi paralleli con massimo 0,5 cm di distanza; 5 lesioni = 1 ferita sanguinante tra i 2 e i 5 cm o una ferita >5cm in fase di guarigione; 16 lesioni = una ferita profonda e aperta > 5cm	
<i>Zoppia lieve¹</i>	Gravemente zoppo, minimo carico sull'arto coinvolto
<i>Zoppia grave¹</i>	Mancato appoggio dell'arto coinvolto e/o inabilità alla deambulazione
<i>Morsicatura coda¹</i>	Sulla coda risulta visibile sangue fresco; evidenze di gonfiore e infezione; parte della coda risulta mancante con formazione di crosta nella zona.
<i>Prolasso rettale¹</i>	Prevalenza di soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
<i>Ernia lieve¹</i>	Presenza di ernia non sanguinante, che non tocca il pavimento e non interferisce con la deambulazione
<i>Ernia grave¹</i>	Presenza di ernia sanguinante e/o che tocca il pavimento
<i>Disordini enterici lievi</i>	Presenza tra il 6% e il 15% di soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
<i>Disordini enterici gravi</i>	Presenza di oltre il 15% di animali con patologia/sintomatologia manifesta
<i>Disordini respiratori lievi</i>	Presenza tra il 5% e il 20% di soggetti con patologia/sintomatologia manifesta
<i>Disordini respiratori gravi</i>	Presenza di oltre il 20% di animali con patologia/sintomatologia manifesta
<i>Polmonite¹</i>	Evidenza di polmonite
<i>Pleurite¹</i>	Evidenza di pleurite
<i>Pericardite¹</i>	Evidenza di pericardite
<i>White spots¹</i>	Evidenza di white spots

¹(WQ 2009)

Tab. 2 - Consumo antimicrobici, frequenza delle osservazioni ABMs in allevamento e dei rilievi al macello (raggruppamento WQ) per ogni allevamento.

Tab. 2 - Antimicrobials usage, on-farm ABMs frequency and slaughterhouse records (WQ grouping) by farm.

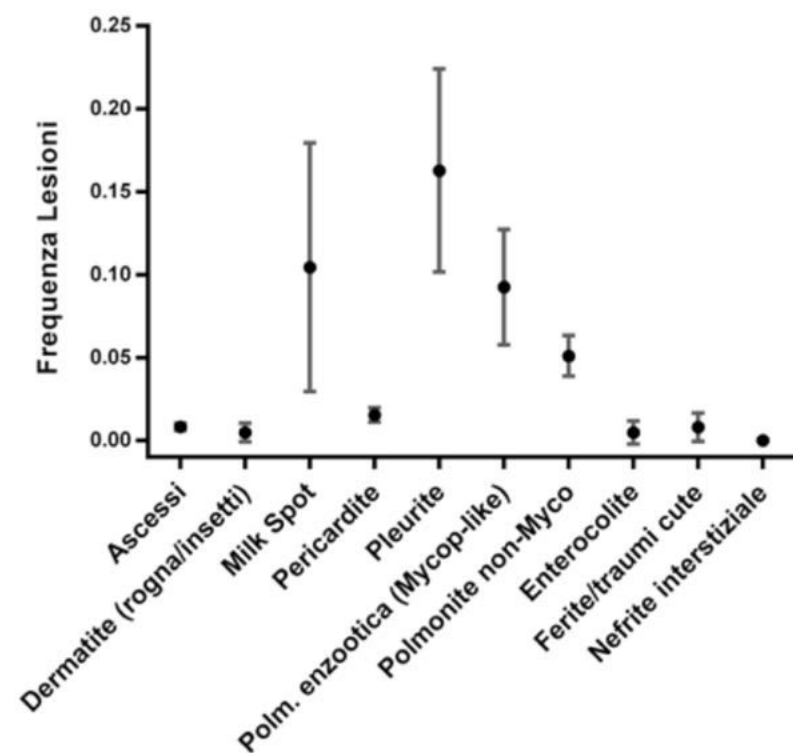
Osservazioni (Consumo Antimicrobici e Frequenza % ABMs)	Allevamenti												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Giorni/Suino 2016	30,6	30,9	21,0	13,7	87,8	6,8	5,1	6,5	0,1	29,0	33,2	19,6	31,1
BCS - Sottopeso	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,8	0,0	0,0	0,5
Bursite lieve	3,7	2,8	9,7	4,5	1,2	2,5	0,6	2,1	3,0	3,0	0,5	3,9	4,2
Bursite grave	1,1	0,0	1,8	0,0	0,0	1,9	0,0	0,5	0,6	0,0	0,0	0,0	0,5
Imbrattam. fecale 1	12,1	6,7	9,7	15,5	34,5	5,1	34,6	4,7	18,1	9,1	17,8	24,2	2,6
Imbrattam. fecale 2	80,5	2,2	4,8	0,0	0,0	85,4	0,0	66,8	7,8	4,3	25,7	14,4	10,6
Lesione corpo lieve	2,6	3,3	4,8	7,1	12,9	7,0	3,1	3,1	2,4	14,0	6,8	10,5	2,6
Lesione corpo grave	0,0	1,1	0,0	0,0	0,0	1,9	0,0	1,0	0,0	1,2	0,5	0,7	0,0
Zoppia lieve	0,5	1,7	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0
Zoppia grave	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Morsicatura coda	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	0,0
Prolasso rettale	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
Ernia lieve	0,0	0,0	0,0	0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Ernia grave	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
Dis. enterici lievi	0,0	0,0	18,2	0,0	17,0	36,9	0,0	0,0	0,0	24,4	39,3	0,0	0,0
Dis. enterici gravi	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
Dis. respiratori lievi	0,0	0,0	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Dis. respiratori gravi	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
Polmoniti (WQ Macello)	11,7	13,2	12,8	11,7	14,3	17,7	20,1	15,7	15,7	14,2	20,2	9,2	10,1
Pleuriti (WQ Macello)	18,9	11,1	16,4	15,7	21,8	9,8	31,9	12,0	14,1	8,4	20,2	15,8	15,7
Pericarditi (WQ Macello)	1,3	1,2	1,5	1,6	2,0	2,1	2,4	1,4	1,7	0,9	1,6	0,9	1,4
White Spot (WQ Macello)	9,4	25,4	8,9	4,3	9,6	4,5	20,1	4,8	20,8	7,4	3,4	2,7	14,8

Tab. 3 - Consumo antimicrobici e frequenza delle osservazioni al macello per ogni allevamento.

Tab. 3 - Antimicrobials usage and frequency of slaughterhouse records (FSIS, FSA) by farm.

Osservazioni (Consumo Antimicrobici e Frequenza % Les. Macello)	Allevamenti												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Giorni/Suino 2016	30,6	30,9	21,0	13,7	87,8	6,8	5,1	6,5	0,1	29,0	33,2	19,6	31,1
Carcasse Valutate	4265	5382	7125	4137	9314	6910	3685	3049	3666	6330	4761	4722	4375
Ascessi	0,7	1,0	0,9	1,2	0,6	0,7	0,9	0,9	0,7	0,5	0,9	1,1	0,7
Dermatite (rogna/ insetti)	0,9	0,1	0,6	0,1	0,8	0,7	0,3	0,0	0,0	2,0	0,3	0,4	0,0
Epatite parassitaria	9,4	25,4	8,9	4,3	9,6	4,5	20,1	4,8	20,8	7,4	3,4	2,7	14,8
Pericardite	1,3	1,2	1,5	1,6	2,0	2,1	2,4	1,4	1,7	0,9	1,6	0,9	1,4
Pleurite	18,9	11,1	16,4	15,7	21,8	9,8	31,9	12,0	14,1	8,4	20,2	15,8	15,7
P. enzoetica (Mycop- like)	6,4	7,7	8,2	5,9	8,9	13,7	13,3	9,9	8,5	9,6	16,9	6,3	5,0
Polmonite non myco	5,4	5,5	4,7	5,8	5,4	4,0	6,8	5,8	7,2	4,6	3,3	2,9	5,2
Enterocolite	2,5	0,1	0,1	0,0	0,6	0,7	1,1	0,0	0,0	0,6	0,1	0,0	0,3
Ferite/traumi cute	0,5	0,1	0,5	0,2	1,2	1,5	1,2	0,1	0,1	0,8	3,1	0,9	0,1
Nefrite interstiziale	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Graf. 1 - Medie e deviazioni standard delle osservazioni al macello
Graf. 1 - Means and standard deviations of slaughterhouse records



OSSERVAZIONI PRELIMINARI SULL'USO DELLE ANIMAL BASED MEASURES NEGLI ALLEVAMENTI INTENSIVI SUINI

PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE USE OF ANIMAL BASED MEASURES IN INTENSIVE PIGS FARM

MAISANO A. M.^{1,2}, ROTA NODARI S.¹, ALBORALI G.L.¹, BEGNI E.³, FADINI M.⁴, GIACOMINI E.¹, INVERNIZZI A.⁵, LAZZARO M.¹, LOMBARDI G.¹, POLLONI A.¹, PRATI P.⁶, ROSIGNOLI C.⁷, SANTUCCI G.¹, SCALI F.¹, VITALI A.⁸, VEZZOLI F.²

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Lodi;

³Azienda Territoriale Sanitaria di Brescia;

⁴Azienda Territoriale Sanitaria della Val Padana

⁵Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Milano

⁶Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Pavia

⁷Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Mantova

⁸Unità Organizzativa Veterinaria, Regione Lombardia

Parole chiave: benessere, ABM, suino, allevamento

Key words: animal welfare, ABM, pig, farm

Riassunto: Il benessere animale è una tematica con un alto impatto sia sull'opinione pubblica che sull'allevamento suinicolo soprattutto nell'ottica della filiera etica. Lo scopo del lavoro è stato quello di verificare su diverse categorie produttive una selezione di Animal Based Measures (ABMs) e valutarne l'applicabilità su larga scala.

Lo studio si è svolto su 125 allevamenti della pianura Padana. Le categorie produttive campionate sono state: verri, scrofe (gestazione e sala parto), sottoscrofa, svezzati, magroni e grassi. Le ABMs più rilevanti (per frequenza e/o impatto sul benessere) in questo studio sono risultate analoghe a quelle raccomandate nella *short-list* dell'EFSA. Inoltre, altre ABMs, riflesso dell'adeguatezza delle strutture, sono state registrate frequentemente, ad esempio bursiti e imbrattamento fecale >30% nei grassi. La frequenza media di alcune ABMs è stata influenzata da poche aziende caratterizzate da un'elevata prevalenza; nella fattispecie: diarree nei sottoscrofa, lesioni alle code nei grassi e zoppie nelle scrofe in box gestazione.

Concludendo, la valutazione del benessere non dovrebbe limitarsi ai soli parametri legislativi ma essere integrata anche da osservazioni dirette sull'animale, quali le ABMs, poiché esse rispecchiano il grado di adattamento dell'animale all'ambiente in cui vive. Le ABMs possono essere applicate su larga scala solo se in numero limitato e accuratamente selezionate secondo la loro frequenza attesa, impatto e riproducibilità.

Abstract: Animal welfare is an important topic with a relevant impact on both public opinion and pig production, particularly, in the so-called ethical production chain. The aims of this study were to test, on different pig categories, a selection of Animal Based Measures (ABMs) and evaluate their feasibility for monitoring welfare in large animal populations.

Assessments were performed on 125 farms, located in Po valley. Productive categories sampled were: boars, sows (farrowing and pregnancy), sucking piglets, weaners, pre-finishers, and finishers.

The most relevant ABMs (frequency and/or impact on animal welfare) observed in this study were similar to the ones recommended by EFSA ABMs short list. Furthermore, other

ABMs, which reflect structures adequacy, has been observed frequently, such as “*presence of bursitis*” and “*manure on the body >30%*” (fattening pigs only). Average frequency of some ABMs was strongly influenced by a small number of farms with high prevalences. These ABMs were: piglets’ diarrhoea, fattening’s tail biting, and pregnant sow’s lameness. In conclusion, animal welfare should not be evaluated only with legislative parameters but also with ABMs which reflect the adaptation of animals to the environment where they live. A feasible approach, on a large animal population, should contemplate a short list of ABMs based on expected frequency, impact, and reproducibility.

INTRODUZIONE

Il benessere animale (BA) nelle produzioni zootecniche risulta ormai un’esigenza e la sua definizione negli anni ha subito varie evoluzioni ed integrazioni, dalle 5 libertà (FAWC 2009) a Huges (Huges 1976) e a Broom (Broom 1986). In sostanza, il soggetto che riesce ad adattarsi all’ambiente si trova in uno stato di benessere, al contrario quello che non ci riesce (perché non ne è in grado per caratteristiche proprie, o perché ne è limitato da fattori esterni) si trova in una condizione di non benessere.

In Italia vige una normativa ben dettagliata per quanto riguarda il benessere suino, derivata dal recepimento delle Direttive Comunitarie attuate con il D.Lgs.122 del 7 luglio 2011 (Dir. 2008/120/CE) e il D.Lgs.146 del 26 marzo 2001 (Dir. 98/58/CE). La normativa fornisce indicazioni prevalentemente di tipo manageriale e strutturale, non definendo in modo preciso limiti per gli aspetti del soddisfacimento dei fabbisogni dell’animale. Protocolli di valutazione più recenti come quello messo a punto dal Welfare Quality® (WQ 2009) prendono in considerazione sia la componente strutturale sia le animal based measures (ABMs) ovvero le osservazioni dirette sull’animale.

Le ABMs sono uno strumento a disposizione del veterinario che evidenzia chiaramente lo stato di salute e benessere dell’animale in quel preciso ambiente e momento. Le osservazioni che possono essere eseguite sono innumerevoli ed è necessario utilizzare quelle più indicative e appropriate per lo scopo dell’utilizzo (EFSA 2012b).

L’EFSA (European Food Safety Authority) si è pronunciata a favore della valutazione congiunta strutture-ABMs (EFSA 2012a; EFSA 2012b; EFSA AHAW 2014) e questi parametri possono essere utilizzati efficacemente per valutare il benessere dei suini in allevamento poiché forniscono informazioni sui principali rischi individuati in precedenti pareri scientifici (EFSA 2005; EFSA 2006; EFSA 2007a; EFSA 2007b; EFSA 2007c).

Questo lavoro, svolto nell’ambito di un progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute, ha avuto come obiettivo l’individuazione delle ABMs più frequenti negli allevamenti suinicoli intensivi per ogni categoria allevata.

MATERIALI E METODI

Scheda di registrazione e allevamenti

Il Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale (CReNBA) dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna (IZSLER) ha elaborato una check-list per la rilevazione del benessere animale nella specie suina che prende in considerazione sia le misure strutturali (conformità a norma di Legge) sia le ABMs più rilevanti secondo la più autorevole letteratura internazionale.

Questo lavoro, svolto in concomitanza da esperti dell’IZSLER e dai Veterinari Ufficiali delle ASL di competenza, mostra i primi risultati a livello di allevamenti intensivi del Nord Italia.

Sulla base di questo approccio, seguendo la check-list proposta dal CReNBA, sono stati

effettuati dei sopralluoghi in 125 aziende suinicole a campione rappresentativo, nelle province di Brescia, Mantova, Lodi, Cremona, Pavia, Milano, Bergamo e Valle Camonica, nel periodo compreso tra marzo e dicembre 2014.

Le rilevazioni sono state effettuate su tutte le categorie presenti in allevamento, e classificate in: scrofe in gabbia di gestazione (70 aziende 958 animali), scrofe in box gestazione (72 aziende 996 animali), verri (69 aziende 267 animali), scrofe in sala parto (74 aziende 946 animali), suinetti in sala parto (73 aziende 974 animali), suinetti in svezzamento (6-30kg; 73 aziende 1048 animali), magroni (30-85kg; 84 aziende 1124 animali) e grassi (85-165Kg; 77 aziende 1100 suini). Le osservazioni ABMs per le varie categorie sono quelle riportate in tab.1, per ogni categoria sono stati esaminati a campione casuale un numero prestabilito di soggetti in base alla numerosità dell’allevamento e alla prevalenza attesa delle osservazioni fissata al 20%; da un minimo di 8 (o altrimenti tutti i soggetti) a un massimo di 14 soggetti per ogni categoria. I dati rilevati sono stati elaborati tramite l’uso di fogli elettronici di calcolo al fine di calcolare la prevalenza media e il relativo intervallo di confidenza al 95% (IC95%).

RISULTATI

I risultati riportati nelle tab. 2, 3 e 4 evidenziano le prevalenze medie di ABMs e i relativi IC 95%, rispettivamente nelle scrofe, nei suini in accrescimento e nei sottoscrofa - verri.

DISCUSSIONE

Scrofe

Le ABMs riscontrate prevalentemente in questa categoria di soggetti coincidono con quelle suggerite (lesioni cutanee, body condition, comportamenti investigatori persistente e stereotipie, zoppie e segni di malattia) da EFSA (EFSA 2012 b). In particolar modo per quanto riguarda le lesioni cutanee, sia da strutture, nelle scrofe in gabbia di gestazione e in sala parto (ferite corpo, rispettivamente 20,0-25,3% e 11,7-16,0% IC95%), che da aggressione per le scrofe in box di gestazione (resto del corpo, 36,8-42,9% IC95%). La presenza cospicua di ulcere della spalla (scrofe in gabbia parto, 4,8-7,9% IC95%) sottolinea la problematica in prevalenza nelle gabbie parto (Bonde *et al.* 2004). Un pessimo body condition score (≤ 2), è stato rilevato in particolare nelle scrofe sia in gabbia parto (2,8-5,3% IC95%) che in gabbia di gestazione (5,7-9,0% IC95%). Per le stereotipie, la masticazione a vuoto, in tutti i reparti, è stata l’osservazione più frequente, seguita dal grattamento contro le strutture e la morsicatura delle barre per le scrofe in gabbia di gestazione, come riscontrato in altri lavori (Sekiguchi e Koketsu 2004). Le zoppie hanno un rilevante impatto sul benessere animale ed in particolare a livello di scrofe in box di gestazione (1,7-3,7% IC95%) (EFSA 2005; 2012b), tuttavia questo dato si evidenzia frequentemente in allevamenti-problema. I segni di malattia riscontrati più assiduamente sono: ascessi in tutti i reparti e “altro clinico”, rappresentato prevalentemente da dermatiti ad eziologia varia (1,5-3,5% IC95% delle scrofe in gabbia). Il 4,8% (3,4-6,2% IC95%) degli animali in gabbia di gestazione con la presenza di ascessi evidenzia una problematica legata al gestione degli aghi (Cleveland-Nielsen A *et al.* 2004). Tuttavia oltre ai sopracitati parametri condivisi, di notevole rilevanza, sono state rilevate altre ABMs di notevole importanza, ovvero: le bursiti, in tutti i reparti (prevalenza massima nelle scrofe in gabbia di gestazione di 18,6-23,8% IC95%), e una pessima condizione dell’igiene del corpo in particolar modo nelle scrofe nei box di gestazione (Imbrattamento cutaneo >30%, 27,5-33,2% IC95%).

Queste osservazioni negative, con prevalenze medie così elevate, denotano una carenza e un’inadeguatezza delle strutture e delle pratiche gestionali negli allevamenti.

Verri

Anche per questa categoria le ABMs con un riscontro prevalente coincidono con quelle suggerite da EFSA tranne che per il *body condition score* (EFSA 2012b). Le lesioni cutanee, essenzialmente da struttura, si concentrano prevalentemente sul corpo (3,2-8,8% IC95%).

Per i verri sicuramente il dato zoppie (0,2-3,5% IC95%) è una tra le ABMs più rilevanti; tuttavia è necessario tener presente anche la vita media e la selezione genetica di questi soggetti che spesso li porta ad un peso corporeo elevato con le relative conseguenze (EFSA 2005; 2007b). I segni di malattia più frequenti si concentrano su altro clinico, che nella totalità si configura con le dermatiti ad eziologia varia (0,7-4,5% IC95%); spesso queste lesioni giocano un ruolo importante in questi soggetti e il corrispettivo atteggiamento di grattamento contro le strutture (2,0-7,0% IC95%) dovrebbe stimolare ad indagini più approfondite e ad un eventuale trattamento di questi animali con antiparassitari se necessari (R. Galuppi *et al.* 2007). Il dato masticazione a vuoto è sicuramente rilevante (3,2-8,8% IC95%) e suggerisce di controllare ed eventualmente adeguare la razione alimentare (EFSA 2007b).

Oltre ai parametri condivisi il rilievo delle bursiti in questa categoria è notevole (5,6-12,4% IC95%) e queste ABMs devono necessariamente essere contemplate insieme al dato zoppie, in relazione alle considerazioni precedenti riguardanti le pavimentazioni (EFSA 2005; EFSA 2007b). Le osservazioni riguardanti il grado d'igiene nei verri, configurano questa categoria come pulita (imbrattamento cutaneo <10% 53,7-65,4% IC95%), tuttavia queste rilevazioni variano sensibilmente tra gli allevamenti.

Sottoscrofa

Nei suinetti sottoscrofa la concordanza con i parametri suggeriti da EFSA si concentra in modo preponderante sui segni di malattia (EFSA 2012b). I soggetti sottopeso (20,0-25,2% IC95%) e le ernie (0,2-1,2% IC95%) sono riscontri significativi e sono legati perlopiù a cause imputabili alle pratiche gestionali e alle linee riproduttive usate (Ding NS *et al.* 2009). Per quanto concerne le patologie enteriche il dato medio è sicuramente incidente (1,2-2,9% IC95%), tuttavia è legato ad allevamenti-problema, ove erano presenti pessime pratiche gestionali (EFSA 2007b).

Oltre alle ABMs selezionate da EFSA (EFSA 2012 b), le lesioni ai carpi, imputabili alle strutture, sono l'osservazione riportata più frequentemente (5,5-8,7% IC95%), e ribadiscono la necessità di garantire una superficie di pavimento pieno sufficiente per tutti i suinetti (EFSA 2007a). Anche le lesioni da aggressione, sia alle orecchie che al tronco, sono state rilevate ripetutamente, in particolare nei soggetti prossimi allo svezzamento. Questi rilievi sottolineano l'importanza di garantire ai lattonzoli l'accesso permanente a materiale manipolabile adeguato, come da raccomandazione UE 2016/336.

Il comportamento purtroppo non è molto indicativo in questa categoria poiché l'ingresso dell'uomo provoca nella quasi totalità un accalcamento; sono stati registrati solo i comportamenti nei suinetti che dopo poco ritornavano a un comportamento normale.

Suini in accrescimento

Le ABMs nei suini in accrescimento coincidono con quelle suggerite (segni di malattia, lesioni cutanee, lesioni alle orecchie e alle code, il comportamento esplorativo e il gruppo delle misure correlate alla termoregolazione) da EFSA (EFSA 2012b). Nella fase di svezzamento il riscontro prevalente è riferito alle lesioni da aggressioni, che con la graduale crescita tendono a diminuire a livello di orecchie mentre tendono ad aumentare a livello di corpo (tab.3). Questi rilievi evidenziano l'importanza di garantire a tutti i suini l'accesso permanente a materiale manipolabile adeguato, come da raccomandazione UE 2016/336. Le lesioni alla coda sono uno tra gli indicatori più rilevanti per il benessere animale (EFSA 2012b)

e sono fortemente influenzati dal taglio della coda; per gli allevamenti selezionati, tutti avevano suini con la coda tagliata e anche se le prevalenze (0,6-1,9% IC95%) sono nelle medie riportate da altri lavori (Scollo *et al.* 2016), queste sono influenzate da allevamenti-problema. Le patologie respiratorie clinicamente manifeste e i sottopeso, sono riscontri frequenti nei reparti di svezzamento e magronaggio. Nella categoria "altro clinico", a livello di grassi (1,2-2,8% IC95%), si riscontrano per lo più dermatiti ad eziologia varia. Il comportamento nei suini in accrescimento cambia notevolmente con il crescere del peso e dell'età, sicuramente la tipologia delle strutture e lo spazio a disposizione giocano un ruolo fondamentale. Difatti nei grassi ove le superfici intese come Kg/m² sono notevolmente ridotte a paragone del magronaggio, le stereotipie sono maggiori (es. cane seduto, 1,4-3,2% IC95%) e i comportamenti positivi di *grooming* limitati (EFSA 2007b).

Oltre alle ABMs suggerite da EFSA, in questo lavoro ne sono state riscontrate di altre con una frequenza rilevante. Tra queste, le zoppie nella categoria dei grassi (0,9-2,4% IC95%) tendono ad aumentare al crescere del peso e dell'età, così come il peggior grado dell'igiene del corpo e le bursiti (tab.3); si rammenta che queste problematiche sono fortemente correlate con le tipologie di pavimento e allo spazio a disposizione (EFSA 2005).

CONCLUSIONI

Le ABMs rilevate, in questo studio preliminare, espongono in modo chiaro le problematiche nei vari reparti degli allevamenti suinicoli intensivi, e restituiscono un'informazione diretta sul reale stato di benessere in cui si trova l'animale fornendo un certo e pratico dato sull'adeguatezza delle caratteristiche strutturali, gestionali e manageriali.

La percentuale media di soggetti con bursiti, nei vari reparti, evidenzia, insieme alle zoppie e alle lesioni agli unghie una situazione rilevante che determina un basso grado di benessere; questi aspetti sono prevalentemente legati alla tipologia di pavimentazione e allo spazio a disposizione (EFSA 2005).

Le ferite da aggressione sono maggiori alla formazione di nuovi gruppi, come ad esempio nello svezzamento e nelle scrofe in box. Per quanto riguarda la rilevazione del comportamento animale, la grande difficoltà riscontrata riguarda le valutazioni etologiche che, se non sono più che evidenti, possono essere interpretate in maniera soggettiva dai rilevatori; per questi rilievi è necessario tener conto in modo particolare delle stereotipie eloquenti, come ad esempio la masticazione a vuoto nei verri e nelle scrofe. Risulta necessario menzionare che le differenze tra i vari allevamenti sono spesso sostanziali per alcune problematiche come ad esempio le patologie enteriche nei suinetti sottoscrofa, le lesioni alle code nei suini in accrescimento o alle zoppie nelle scrofe. Questo lavoro, seppur preliminare, è fortemente suggestivo di quali possano essere le ABMs più frequentemente riscontrabili negli allevamenti suinicoli; inoltre, tali ABMs sono risultate, nella maggior parte casi, le stesse indicate nella "*short list*" dell'EFSA (EFSA 2012b). Tuttavia è fondamentale rimarcare che alcune ABMs fortemente influenzate dalle strutture, come l'igiene del corpo e le bursiti, vengano incluse nelle valutazioni di base assieme a quelle già raccomandate da EFSA. In prospettiva futura, ai fini di una corretta applicabilità su ampia scala, sarà necessario identificare un pacchetto limitato di ABMs, selezionando tali misurazioni in base alla loro frequenza attesa, impatto sul benessere animale e riproducibilità.

La valutazione del benessere animale deve necessariamente contemplare sia le misure indirette, per il controllo delle conformità legislative, che le ABMs per verificare il grado di adattamento degli animali all'ambiente in cui vivono. Il ruolo del veterinario per la valutazione del benessere animale è fondamentale poiché esso rappresenta l'unica figura professionale in grado di giudicare obiettivamente entrambe le categorie di misura.

BIBLIOGRAFIA

- Bonde M., Rousing, T., Badsberg J. H., Sørensen J. T. (2004) "Associations between lying-down behaviour problems and body condition, limb disorders and skin lesions of lactating sows housed in farrowing crates in commercial sow herds". *Livest Prod Sci.* 87(2), 179-187.

- Broom D.M. (1986) "Indicators of poor welfare". *Br Vet J.* 142, 524-526.

- Cleveland-Nielsen A., Christensen G., Ersbøll A.K. (2004) "Prevalences of welfare-related lesions at post-mortem meat-inspection in Danish sows". *Prev Vet Med.* 64, 123-131.

- Ding N.S., Mao H.R., Guo Y.M., Ren J., Xiao S.J., Wu G.Z., Shen H.Q., Wu L.H., Ruan G.F., Brenig B., Huang L.S. (2009) "A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian". *J Anim Sci.* 87(8), 2469-2474.

- EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare) (2014) "Scientific Opinion concerning a multifactorial approach on the use of animal and non-animal-based measures to assess the welfare of pigs". *EFSA Journal.* 12(5), 3702

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

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

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

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

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

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

- FAWC (Farm Animal Welfare Council) (2009) "Farm Animal Welfare in Great Britain: Past, Present and Future". Available at <http://www.fawc.org.uk/reports.htm>

- Galuppi R., Avenoso A.M., Leotti, G., Ostanello, F., Poglayen, G. and Tampieri, M.P. (2007) "Diagnosis of sarcoptic Mange in Slaughtered Swine". *Vet Res Commun.* 31(Suppl.1), 233-236.

- Hughes B.O. (1976) "Behaviour as an index of welfare". *Proceedings of the Fifth European Poultry Conference.* Malta, 1005-1018.

- Scollo A., Contiero B., Gottardo F. (2016) "Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight". *Vet J.* 207, 92-98.

- Sekiguchi T., Koketsu Y. (2004) "Behavior and reproductive performance by stalled breeding females on a commercial swine farm". *J Anim Sci.* 82(5), 1482-1487.

- WQ (Welfare Quality® Protocol) (2009) "Welfare Quality® Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs)". Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.
Available at <http://www.welfarequalitynetwork.net/downloadattachment/45627/21651/Pig%20Protocol.pdf>

Tab. 1 - Osservazioni ABMs eseguite in allevamento.

Tab. 1 - ABMs at farm.

Categoria Produttiva	Osservazioni Effettuate (ABMs)
Scrofa (tutte le cat.) Verri Suinetti in svezzamento Magroni Grassi	Igiene corpo (imbrattamento fecale <10%, 10-30%, >30%), ferite contro le strutture (ferite corpo, unghielli, altro), condizione clinica (ascessi, patologie respiratorie, n° bursiti, patologie enteriche, forme neurologiche, prolasso del retto, altro), stereotipie (morsicatura barre, morsicatura mangiatoia, gioco con l'acqua, grattamento contro le strutture, cane seduto, altro)
Scrofa in gabbia di gestazione	Ferite contro le strutture (ferite corpo, unghielli, altro), condizione clinica (BCS, ulcera della spalla, scoli vulvari, prolasso utero), stereotipie (<i>tongue rolling</i>)
Scrofa in box gestazione	Lesioni da aggressione (vulva, coda, resto del corpo), condizione clinica (BCS, ulcera della spalla, scoli vulvari, prolasso utero), stereotipie (<i>tongue rolling</i>), comportamenti aggressivi (aggressività verso le altre scrofe, aggressione vulva), interazioni positive (<i>grooming</i> , altro)
Scrofa in gabbia parto	Lesioni da strutture (ferite alla testa), lesioni da aggressione (vulva, mammelle e capezzoli), condizione clinica (BCS, ulcera della spalla, mastite, prolasso utero), stereotipie (<i>tongue rolling</i>), comportamenti aggressivi (aggressività verso i suinetti, cannibalismo)
Verri	Lesioni da aggressione (testicoli, resto del corpo), condizione clinica (BCS, ulcera della spalla, atrofia del grugno), stereotipie (<i>tongue rolling</i>), comportamenti aggressivi aggressività verso altri verri) e interazioni positive tra gli animali (<i>grooming</i> , altro)
Lattonzoli in gabbia parto	Lesioni da aggressione (orecchie, tronco, arti, coda), ferite contro le strutture (ferite corpo, unghielli, carpo, altro), condizione clinica (sottopeso, <i>splay leg</i> , patologie respiratorie, ascessi, deambulazione difficoltosa, patologie enteriche, forme neurologiche, ernie, atresia ano, altro), rilievi comportamentali (suzione dell'ombelico, suzione del prepuzio, suzione-morsicatura orecchio, <i>bell noising</i> , accalcamento, morsicatura vulva scrofa, altro), interazioni positive tra gli animali (gioco, <i>grooming</i> , altro)
Suinetti in svezzamento	Lesioni da aggressione (orecchie, tronco, arti e coda), condizione clinica (sottopeso, ernie), comportamenti aggressivi (<i>bell noising</i> , suzione dell'ombelico, suzione del prepuzio, suzione-morsicatura orecchie, morsicatura coda, attacchi laterali-frontali, accalcamento, altro) e interazioni positive tra gli animali (gioco-corse, <i>grooming</i> , altro)
Magroni Grassi	Lesioni da aggressione (orecchie, tronco, <i>flanks biting</i> , arti e coda), ferite contro le strutture (ferite corpo, unghielli, altro), condizione clinica (sottopeso, ernie), comportamenti aggressivi (<i>bell noising</i> ; suzione dell'ombelico; suzione del prepuzio; morsicatura orecchie, morsicatura fianco, arti, tronco, coda; altro) e interazioni positive tra gli animali (gioco-corse, <i>grooming</i> , altro)

Tab. 2 - Rilievi eseguiti sulle scrofe in allevamento nei vari reparti
Tab. 2 - Findings at farm on sows at different stage

Categoria	ABM	Scrofe gabbia gestazione		Scrofe box gestazione		Scrofe gabbia parto	
		Prevalenza (%)	IC 95% (%)	Prevalenza (%)	IC 95% (%)	Prevalenza (%)	IC 95% (%)
Igiene corpo	Imbrattamento <10%	59,9	56,8-63,0	32,0	29,1-34,9	88,4	86,3-90,4
	Imbrattamento 10-30%	27,7	24,8-30,5	37,6	34,5-40,6	9,7	7,8-11,6
	Imbrattamento >30%	12,4	10,3-14,5	30,3	27,5-33,2	0,2	0,0-0,5
Lesioni da aggressione	Vulva			2,9	1,9-4,0	1,1	0,4-1,7
	Mammelle-capezzoli					3,4	2,2-4,5
	Coda			0,9	0,3-1,5		
	Resto del corpo			39,9	36,8-42,9		
Lesioni da strutture	Ferite corpo	22,7	20,0-25,3	8,9	7,2-10,7	13,8	11,7-16,0
	Ferite Testa	0,8	0,3-1,4			5,1	3,7-6,5
	Unghielli	4,6	3,3-5,9	1,8	1,0-2,6	7,2	5,5-8,8
	Altro/strutture	2,2	1,3-3,1	0,6	0,1-1,1	0,5	0,1-1,0
Condizione clinica	BCS ≤ 2	7,3	5,7-9,0	2,4	1,5-3,4	4,0	2,8-5,3
	Rogna	2,1	1,2-3,0	0,2	0,0-0,5	0,4	0,0-0,8
	Ulcera Spalla	4,4	3,1-5,7	1,8	1,0-2,6	6,3	4,8-7,9
	Ascessi	4,8	3,4-6,2	3,2	2,1-4,3	4,4	3,1-5,8
	Patologie Respiratorie	0,1	0,1-0,3	0,4	0,0-0,8	0,3	0,0-0,7
	Soggetti con bursiti	21,2	18,6-23,8	17,1	14,7-19,4	15,3	13,0-17,6
	Zoppia	1,7	0,9-2,5	2,7	1,7-3,7	0,6	0,1-1,1
	Patologie Enteriche	0,2	0,0-0,5	0,0	0-0	0,1	0,0-0,3
	Scoli vulvari	0,9	0,3-1,6	0,1	0,0-0,3	0,2	0,0-0,5
	Mastite					1,3	0,6-2,0
	Prolasso utero	0,0	0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	Prolasso retto	0,0	0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	Altro clinico	2,5	1,5-3,5	0,8	0,3-1,4	1,3	0,6-2,0
	Masticazione a vuoto	7,4	5,8-9,1	6,4	4,9-7,9	8,6	6,8-10,3
	<i>Tongue rolling</i>	0,7	0,2-1,3	0,1	0,0-0,3	0,4	0,0-0,8
	Morsicatura barre	3,0	1,9-4,11	0,5	0,1-1,09	2,9	1,8-3,9
Stereotipie	Morsicature Mangiatoia	0,9	0,3-1,6	0,2	0,1-0,5	1,6	0,8-2,4
	Gioco acqua	0,1	0,0-0,3	0,5	0,1-0,9	0,7	0,2-1,3
	Grattamento strutture	4,2	2,9-5,4	0,8	0,3-1,4	1,3	0,6-2,0
	Cane seduto	0,3	0,0-0,7	0,3	0,0-0,6	0,8	0,3-1,4
	Altre stereotipie	0,0	0,0-0,0	0,4	0,0-0,8	0,0	0-0
	Aggress. vs altre scrofe			0,2	0,0-0,5		
	Aggress. vs i suinetti					0,0	0-0
Comportamenti aggressivi	Cannibalismo					0,0	0-0
	Aggressione vulva			0,0	0-0		
	<i>Grooming</i>			1,7	0,9-2,5		
Interazioni positive	Altro			0,0	0-0		

Tab. 3 - Rilievi eseguiti sui suini in accrescimento nei vari reparti
Tab. 3 - Findings at farm on weaners, pre-finishers, and finishers

Categoria	ABM	Svezzamento		Magronaggio		Ingrasso	
		Prevalenza (%)	IC 95% (%)	Prevalenza (%)	IC 95% (%)	Prevalenza (%)	IC 95% (%)
Igiene corpo	Imbrattamento <10%	83,2	81,0-85,5	58,3	55,4-61,2	36,0	33,2-38,8
	Imbrattamento 10-30%	12,9	10,9-14,9	30,9	28,2-33,6	26,7	24,1-29,3
	Imbrattamento >30%	2,5	1,5-3,4	9,5	7,8-11,2	37,1	34,2-39,9
Lesioni da aggressione	Orecchie	17,3	15,0-19,6	14,3	12,3-16,4	15,6	13,5-17,8
	Tronco	18,7	16,3-21,1	22,7	20,2-25,1	21,3	18,9-23,7
	<i>Flanks biting</i>			0,1	0,0-0,3	0,6	0,17-1,1
	Arti	0,3	0,0-0,6	0,9	0,3-1,4	1,5	0,8-2,3
	Coda	0,8	0,2-1,3	0,9	0,3-1,4	1,3	0,6-1,9
Lesioni da strutture	Ferite corpo	1,5	0,8-2,3	3,1	2,1-4,1	4,8	3,6-6,1
	Unghielli	0,5	0,1-0,9	0,4	0,1-0,8	1,5	0,7-2,2
	Altro	0,1	0,0-0,3	0,1	0,0-0,3	0,0	0-0
Condizione clinica	Sottopeso	3,7	2,6-4,9	1,0	0,4-1,6	0,1	0,0-0,27
	Rogna		0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	Ascessi	0,7	0,2-1,2	1,6	0,9-2,3	0,5	0,1-1,0
	Patologie respiratorie	2,7	1,7-3,7	1,9	1,1-2,7	1,0	0,4-1,6
	Soggetti con bursiti	2,7	1,7-3,7	17,1	14,9-19,3	23,4	20,9-25,9
	Zoppia	0,1	0,0-0,3	0,5	0,1-1,0	1,6	0,9-2,4
	Patologie enteriche	0,8	0,2-1,3	0,4	0,1-0,8	0,1	0,0-0,3
	Patologie neurologiche	0,2	0,0-0,5	0,4	0,0-0,7	0,1	0,0-0,3
	Ernie	0,3	0,0-0,6	0,7	0,2-1,2	0,5	0,1-0,9
	Prolasso retto	0,0	0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	Altro clinico	0,7	0,2-1,2	0,9	0,3-1,4	2,0	1,2-2,8
	Masticazione a vuoto			0,4	0,1-0,8	1,5	0,8-2,2
	Morsicatura barre	1,1	0,4-1,7	0,5	0,1-1,0	0,4	0,0-0,7
Stereotipie	Morsicatura mangiatoia	0,0	0-0	0,4	0,1-0,8	0,1	0,0-0,3
	Gioco acqua	0,0	0-0	0,4	0,0-0,7	0,4	0,0-0,7
	Grattamento strutture	0,0	0-0	0,9	0,3-1,4	0,9	0,4-1,5
	Cane seduto	1,2	0,5-1,8	0,7	0,2-1,2	2,3	1,4-3,2
	Altre stereotipie	0,0	0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	<i>Bell nosing</i>	0,3	0,0-0,6	0,1	0,0-0,3	0,0	0-0
Comportamenti aggressivi	Suzione ombelico	0,0	0-0	0,0	0-0	0,0	0-0
	Suzione prepuzio	0,1	0,0-0,3	0,0	0-0	0,0	0-0
	Suzione-morso orecchio	0,7	0,2-1,2	1,1	0,5-1,7	0,0	0-0
	Morsicatura fianco			0,2	0,0-0,4	0,0	0-0
	Morsicatura arti			0,2	0,0-0,4	0,0	0-0
	Morsicatura tronco			0,2	0,0-0,4	0,0	0-0
	Morsicatura coda	0,3	0,0-0,6	0,2	0,0-0,4	0,1	0,0-0,3
	Altro aggressività	0,0	0-0	0,0	0-0		
	Attacchi Lat-Frontali	0,5	0,1-0,9	0,3	0,0-0,6	0,1	0,0-0,3
	Accalcamento	1,1	0,4-1,7	0,0	0-0	0,0	0-0
	<i>Grooming</i>	11,8	9,9-13,8	9,9	8,1-11,6	6,5	5,1-8,0
Interazioni positive	Altro	0,0	0-0	0,7	0,2-1,2	0,5	0,1-0,9
	Gioco	4,5	3,2-5,7	2,7	1,7-3,6	0,0	0-0

Tab. 4 - Rilievi eseguiti sui suinetti in gabbia parto e i verri
Tab. 4 - Findings at farm on sucking piglets and boars

Categoria	ABM	Lattonz. gabbia parto		Categoria	ABM	Verri	
		Prevalenza (%)	IC 95% (%)			Prevalenza (%)	IC 95% (%)
Lesioni da aggressione	Orecchie	5,0	3,7-6,4	Igiene del corpo	Imbrattamento <10%	59,6	53,7-65,4
	Tronco	4,7	3,4-6,1		Imbrattamento 10-30%	22,8	17,8-27,9
	Arti	0,7	0,2-1,3		Imbrattamento >30%	17,2	12,7-21,8
	Coda	0,9	0,3-1,5	Lesioni da aggressione	Testicoli	0,0	0-0
Lesioni da strutture	Ferite corpo	1,4	0,7-2,2	Lesioni da strutture	Resto del corpo	1,9	0,3-3,5
	Unghielli	0,3	0,0-0,7		Ferite corpo	6,0	3,2-8,8
	Carpo	7,1	5,5-8,7		Unghielli	1,5	0,0-3,0
	Altro	0,4	0,0-0,8		Altro strutture	0,0	0-0
Condizione clinica	Sottopeso	22,6	20,0-25,2	Condizione clinica	BCS≤2	0,7	0,0-1,8
	Splay leg	0,1	0,0-0,3		Rogna	0,4	0,0-1,1
	Patologie respiratorie	0,7	0,2-1,3		Ulcera Spalla	1,9	0,2-3,5
	Ascessi	0,4	0,0-0,8		Ascessi	1,1	0,0-2,4
	Deambulazione difficoltosa	1,3	0,6-2,1		Patologie Respiratorie	0,0	0-0
	Patologie enteriche	2,1	1,2-2,9		Soggetti con bursiti	9,0	5,6-12,4
	Patologie neurologiche	0,0	0-0		Zoppia	1,9	0,2-3,5
	ernie	0,7	0,2-1,2		Patologie Enteriche	0,7	0,0-1,8
	Atresia ano	0,0	0-0		Prolasso retto	0,0	0-0
	Altro clinico	0,0	0-0		Altro clinico	2,6	0,7-4,5
Rilievi comportamentali	Suzione ombelico	0,5	0,1-1,0	Stereotipie	Masticazione a vuoto	6,0	3,2-8,8
	Suzione prepuzio	0,0	0-0		Tongue rolling	1,5	0,0-3,0
	Suzione-morso orecchio	0,5	0,1-1,0		Morsicatura barre	1,5	0,0-3,0
	Bell nosing	0,3	0,0-0,7		Morsicature Mangiatoia	0,7	0,0-1,8
	Accalcamento	2,5	1,5-3,4		Gioco acqua	0,4	0,0-1,1
	Morsicatura scrofa	0,1	0,0-0,3		Grattamento strutture	4,5	2,0-7,0
	Altre stereotipie	0,0	0-0		Cane seduto	0,0	0-0
Interazioni positive	Grooming	2,9	1,8-3,9	Comportamenti aggressivi	Altre stereotipie	0,0	0-0
	Gioco	3,5	2,3-4,6		Aggressività Verso altri verri	0,0	0-0
	Altro	0,0	0-0	Interazioni positive	Grooming	0,0	0-0
					Altro	0,0	0-0

**IL RUOLO DEL TRASPORTO AL MACELLO NELLA
DIFFUSIONE DELLA DISSENTERIA SUINA**

**THE ROLE OF TRANSPORTATION TO SLAUGHTERHOUSE IN
THE SWINE DYSSENTERY SPREADING**

LAZZARO M.¹, GIACOMINI E.¹, SANTUCCI G.¹, MAISANO A.M.¹, SCALI F.¹,
BONIOTTI M. B.¹, CORRADI A.², GASPARRINI S.¹, PASQUALI P.^{3,4}, ALBORALI G. L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Sezione di Brescia

²Università degli Studi di Parma - Dipartimento di Scienze Veterinarie

³Istituto Superiore di Sanità

⁴ Centro di Referenza per la Sanità Pubblica Veterinaria FAO

Parole chiave: Dissenteria suina, *Brachyspira hyodysenteriae*, Trasporti

Key words: Swine dysentery, *Brachyspira hyodysenteriae*, Transportation

Riassunto: *Brachyspira hyodysenteriae*, principale agente della dissenteria suina (SD), può essere introdotta in azienda attraverso diverse vie. L'obiettivo dello studio è stato indagare la presenza dell'agente nei camion che trasportano suini al macello, così da definirne il potenziale ruolo nella diffusione. Sono stati selezionati casualmente 212 camion presso due macelli industriali ed i campioni ambientali prelevati tra lo scarico dei suini e le procedure di sanificazione. Lo screening per la ricerca di *B. hyodysenteriae* è stato effettuato con PCR-Real Time. Sono risultati positivi 84 dei 1322 (6,26%) campioni raccolti che provenivano da 49 dei 212 (23,11%) camion controllati. La probabilità d'identificare un campione positivo da un camion aumentava col numero di controlli fino al 94,44% (>20 campioni/veicolo). L'odds ratio dei veicoli con almeno 10 campioni è risultato 37,94 (IC 95% 14,03-102,61, P<0,0001) rispetto agli altri. I veicoli possono rappresentare una fonte di rischio per la diffusione di *B. hyodysenteriae* e le procedure di sanificazione degli automezzi al macello sono un punto critico. Un monitoraggio regolare, su campioni pre- e post-sanificazione, può fornire informazioni rilevanti su fonti di diffusione e prevenzione della SD. Per limitare i rischi di propagazione di *B. hyodysenteriae* attraverso il trasporto, pulizia e disinfezione degli automezzi al macello sono fondamentali così come le misure di biosicurezza in azienda, soprattutto legate al carico dei suini.

Abstract: *Brachyspira hyodysenteriae*, the main cause of swine dysentery (SD), can be introduced in a herd through different ways. The aim of this study was to investigate the presence of *B. hyodysenteriae* in trucks transporting pigs to slaughterhouses, hence, to define their potential role in spreading the agent. Trucks were randomly selected at two large slaughterhouses; environmental samples were collected between the unload of pigs and cleaning procedures. A multiplex real time-PCR was used to screen the presence of *B. hyodysenteriae*. 84 out of 1332 (6.26%) collected samples were PCR positive, those samples were collected from 49 out of 212 (23.11%) selected trucks. Likelihood of identifying, at least, one positive sample from a truck increased according to number of samples per trucks, up to 94.44% (<20 samples/truck). Odds ratio of trucks sampled at least 10 times was 37.94 (95% CI 14.03-102.61; P<0,0001) when compared with others. Trucks may represent a potential source of *B. hyodysenteriae* spreading while cleaning and disinfection procedures at the slaughterhouse are a critical point which should be controlled. Regular screening, on samples collected before and after cleaning, should provide relevant information regarding

spread and prevention of SD. Risks of spreading *B. hyodysenteriae*, via trucks, can be greatly decreased by proper cleaning and disinfection at the slaughterhouse. Biosecurity measures at farm, particularly when loading pigs, can further reduce those risks.

INTRODUZIONE

La dissenteria del suino (SD), comunemente nota come diarrea rossa, è una patologia enterica che può avere impatti sanitari ed economici notevoli in allevamento, soprattutto durante i periodi di crescita e finissaggio dei suini da ingrasso. La SD è sostenuta primariamente da *Brachyspira hyodysenteriae*, tuttavia, altre spirochete emolitiche del genere *Brachyspira*, come *Brachyspira hampsonii*, sono state identificate tra i possibili agenti di SD (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013; Mirajkar *et al.*, 2016), tuttavia quest’ultima non è mai stata isolata in Italia.

La trasmissione di *B. hyodysenteriae* avviene sovente tra suini per via diretta con ingestione di deiezioni infette, inoltre, l’agente può essere introdotto e diffuso in allevamento anche attraverso altre modalità quali calzature ed indumenti contaminati di visitatori e personale, veicoli per il trasporto dei suini ed animali selvatici in grado di accedere all’azienda (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2013).

I camion dediti al trasporto dei suini possono costituire un’importante fonte di rischio per la propagazione della malattia tra allevamenti anche distanti, in particolar modo quelli adibiti al trasporto verso i macelli (Thakur *et al.* 2016). In linea generale, il rischio di trasmissione degli agenti infettivi tende ad aumentare progressivamente quando il trasporto degli animali riguarda più allevamenti, anche se i carichi sono separati temporalmente in diversi invii mono-allevamento (Bigras-Poulin *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2013).

Lo scopo del presente lavoro è stato quello d’indagare l’eventuale presenza di *B. hyodysenteriae* sui mezzi che trasportano i suini al macello, così da inquadrarne il potenziale ruolo nella diffusione del batterio.

MATERIALI E METODI

Campionamento e analisi di laboratorio

Nel periodo tra gennaio del 2015 e luglio del 2017, sono stati campionati 212 camion presso due macelli industriali del nord Italia; i camion trasportavano unicamente suini pesanti a fine ciclo provenienti da: nord Italia, centro Italia, alcuni Paesi UE (Francia, Croazia, Ungheria).

I campioni sono stati prelevati, dopo lo scarico dei suini, tramite *sponge stick* sterili monouso, strisciando questi ultimi lungo il perimetro e nei quattro angoli del piano inferiore dei camion. La scelta degli automezzi è stata casuale, tuttavia, il numero di volte in cui ciascun veicolo è stato campionato durante il periodo dello studio è stato vincolato dall’orario e dal giorno della settimana in cui gli operatori potevano eseguire i prelievi. I camion sono stati categorizzati in base al numero di campionamenti cui sono stati sottoposti e suddivisi in quattro categorie di ordine crescente: prima (1-4 campionamenti); seconda (5-9); terza (10-19); e quarta (>20). Tutti i campioni sono stati trasportati nei rispettivi sacchetti sterili a temperatura di +4°C e processati in giornata.

Analisi di laboratorio

I campioni sono stati analizzati presso la sezione di Brescia dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia-Romagna (IZSLER) e sono stati processati secondo il seguente protocollo diagnostico: i campioni sono stati lavati con 50 ml di soluzione salina e il liquido di lavaggio è stato trasferito in una provetta sterile per la

chiarificazione in centrifuga a 1500 rpm per 5 minuti. L’estrazione del DNA è stata eseguita con 1 ml del surnatante di ciascun campione utilizzando il kit d’estrazione DNeasy Blood & Tissue (Qiagen® GmbH, Germania). Il DNA batterico è stato eluito in 100 µl di buffer di eluizione. Successivamente i campioni, così composti, sono stati processati tramite PCR-Real Time secondo la metodica descritta da Willems e colleghi (Willems *et al.*, 2010).

Analisi statistiche

La gestione del database, i calcoli di prevalenza e relativo intervallo di confidenza al 95% (IC95%) sono stati eseguiti col software Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA). Il confronto tra le frequenze di veicoli positivi e negativi, secondo il numero di campionamenti per singolo camion (*cut-off* 10 campioni/veicolo), è stato eseguito col test esatto di Fisher; tale test è stato svolto utilizzando GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Campionamento

In totale, durante il periodo dello studio, sono stati raccolti 1342 campioni; In tabella 1 sono riportati i risultati, suddivisi per anno, relativi al campionamento ed alle prevalenze dei tamponi positivi a *B. hyodysenteriae*. I campioni positivi derivavano da 49 (23,11%) dei 212 camion presi in esame, in questi 49 veicoli la mediana di campioni positivi sul totale dei raccolti è stata pari a 11,76% (*range* 2-100%).

Categorizzazione dei veicoli

In figura 1 è illustrata la distribuzione di campion per ciascuna categoria. La maggior parte degli automezzi apparteneva alla prima categoria (1-4 campionamenti) per un totale di 145 veicoli; nella seconda (5-9), terza (10-19) e quarta (≥20) categoria sono stati identificati rispettivamente 32, 17 e 18 camion. In figura 2 sono illustrate le frequenze di positività, a livello di camion (almeno un campione positivo), per ciascuna categoria. Il numero di campioni eseguiti per ciascun automezzo ha influenzato significativamente ($P < 0,0001$) la frequenza di positività a livello di camion. L’*odds ratio* dei veicoli campionati almeno dieci volte è risultato pari a 37,94 (IC 95% 14,03-102,61) rispetto a quelli campionati da una a nove volte.

Tab. 1 - Campionamento e risultati suddivisi per anno: campioni totali, campioni positivi alla PCR, prevalenze e relativi intervalli di confidenza al 95%.

Tab. 1 - Sampling and results by year: total samples, PCR-positive samples, prevalence, and 95% confidence interval.

Anno	Campionamento			
	Totale	Positivi	Prevalenza (%)	IC95 (%)
2015	531	41	7,72	5,45-9,99
2016	197	16	8,12	4,31-11,93
2017	614	27	4,40	2,78-6,02
TOT	1342	84	6,26	4,96-7,56

Fig. 1 - Numero di veicoli suddivisi per categoria, la categorizzazione degli automezzi è stata effettuata considerando il numero di campionamenti per camion durante il periodo dello studio.

Fig. 1 - Number of trucks per category, trucks categorisation was carried out considering the number of sample per truck during the study.

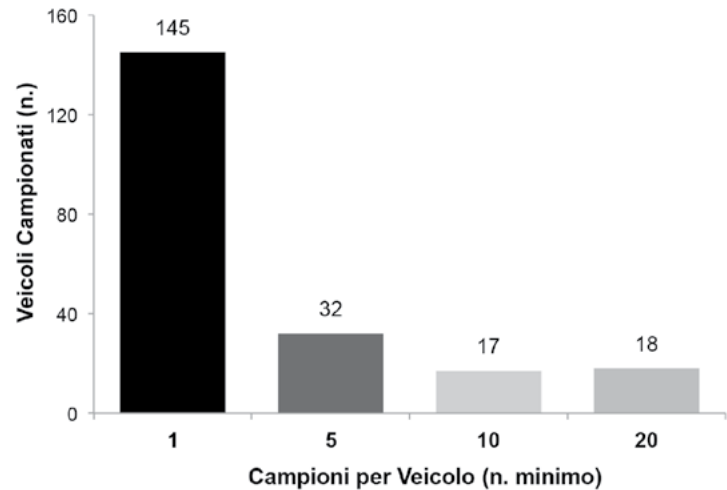
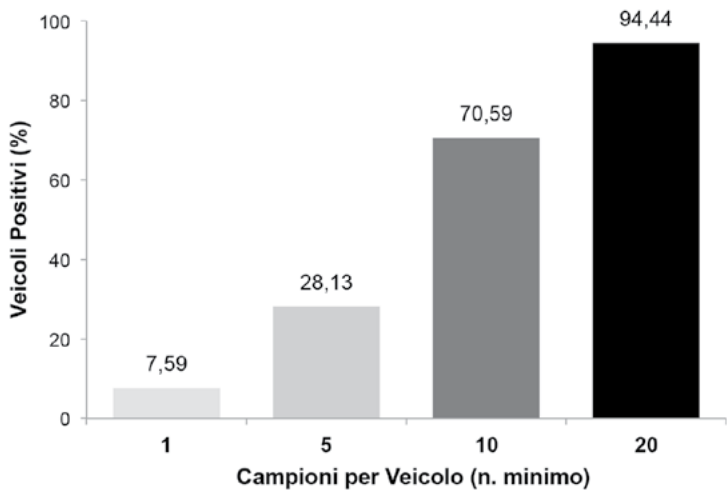


Fig. 2 - Prevalenze, suddivise per categoria, di *B. hyodysenteriae* a livello di camion. La categorizzazione degli automezzi è stata effettuata considerando il numero di campionamenti per camion durante il periodo dello studio.

Fig. 2 - *B. hyodysenteriae* prevalences, at truck-level, for each category. Trucks categorisation was carried out considering the number of samples per truck during the study.



DISCUSSIONE

La prevalenza di campioni positivi a *B. hyodysenteriae*, su un totale di 1342, si è assestata attorno al 6%; un risultato in linea con quanto evidenziato in uno studio pubblicato recentemente (Giacomini *et al.*, 2018); inoltre, anche esaminando tali risultati stratificati per anno (vedi tab. 1), date le sovrapposizioni degli IC, non sono emerse vistose variazioni nella prevalenza, nonostante la distribuzione dei campioni raccolti non fosse omogenea nei diversi periodi.

L'impossibilità di effettuare un monitoraggio uniforme e sistematico di tutti i veicoli campionati ha rappresentato uno dei principali limiti di questo studio, tuttavia, sono comunque emersi risultati interessanti. Mettendo a confronto le informazioni illustrate in figura 1 e figura 2 si può osservare quanto aumenti la probabilità di rilevare almeno un campione positivo su un camion in seguito a controlli ripetuti, anche se il numero di camion appartenenti alle due categorie con la maggior quantità di campioni/veicolo sia notevolmente inferiore alle altre due (fig. 1). Tale andamento è stato confermato anche dal test esatto di Fisher, eseguito considerando un *cut-off* di 10 campioni/veicolo, caratterizzato da un *p-value* molto basso ($<0,0001$) e *odds ratio* elevato (>35). Verosimilmente, se i veicoli appartenenti alle prime due categorie e risultati sempre negativi fossero stati monitorati più frequentemente durante lo studio avrebbero anch'essi mostrato delle positività.

Il ruolo dei veicoli utilizzati nel trasporto di animali nella diffusione indiretta (vettori inanimati) di alcuni agenti infettivi è noto, come ad esempio per l'afta epizootica (Alexandersen *et al.*, 2003), la sindrome respiratoria riproduttiva dei suini (Dee *et al.*, 2002; Dee *et al.*, 2004a) e la diarrea epidemica del suino (Lowe *et al.*, 2014). Un recente studio ha evidenziato potenziali rischi legati al trasporto di animali vivi anche per *B. hyodysenteriae*, identificando delle positività persino in campioni provenienti da camion che avevano già subito i trattamenti di pulizia e disinfezione (Giacomini *et al.*, 2018). Tali positività erano piuttosto rare ($<1\%$) tuttavia la prevalenza nei controlli post-sanificazione è stata verosimilmente sottostimata data la difficoltà degli Autori a campionare i veicoli teoricamente puliti, soprattutto camion con programmi di consegna molto fitti (Giacomini *et al.*, 2018).

È importante ricordare che i rischi legati al trasporto possono però essere mitigati da adeguate procedure di pulizia e disinfezione dei i veicoli adibiti al trasporto nonché da rigorose misure di biosicurezza presso l'entrata in allevamento (Robertson *et al.*, 1992; Dee *et al.*, 2004b). Inoltre, nuove tecniche biomolecolari, quali MLVA o MLST, possono aiutare a comprendere e tracciare sia l'evoluzione dei ceppi sia le fonti della loro diffusione (Mirajkar *et al.*, 2014; Gasparrini *et al.*, 2017; Giacomini *et al.*, 2018).

CONCLUSIONI

La forte influenza che il numero di campionamenti per veicolo sembra esercitare sulla frequenza delle positività, a livello di singolo camion, suggerisce che il monitoraggio debba essere eseguito con una certa regolarità per raggiungere risultati attendibili. I campioni ambientali raccolti sui camion potrebbero peraltro essere sfruttati anche per lo screening di diversi agenti patogeni ad elevato impatto (sanitario, economico e zoonosico) così da delineare un quadro epidemiologico più ampio.

L'elevata frequenza di positività a livello di camion, rilevata nei veicoli campionati ripetutamente, rende evidente, ancora una volta, quanto sia indispensabile per gli autotrasportatori seguire sistematicamente uno scrupoloso protocollo di pulizia e sanificazione; poiché gli automezzi possono fungere da vettore per la disseminazione di *B. hyodysenteriae*. Le procedure di lavaggio e disinfezione dei veicoli rappresentano un punto critico di controllo, per impedire la diffusione di *B. hyodysenteriae* e altri patogeni, in

particolare a livello di macello ove i ritmi serrati impongono tempi ridotti; pertanto, anche dopo queste procedure andrebbero effettuati degli screening, a cadenza regolare, così da verificare l'efficacia della sanificazione.

Al fine di ridurre il rischio che l'agente venga introdotto in azienda da veicoli non correttamente sanificati è importante seguire sempre le buone norme di biosicurezza, in particolare: utilizzare un'area di carico dei suini separata; impedire al trasportatore di accedere ai capannoni; creare una barriera sanitaria tra "area sporca" ed "area pulita"; fornire sempre indumenti e calzature monouso ai visitatori; adottare ove possibile il tutto pieno-tutto vuoto.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarez-Ordóñez A, Martínez-Lobo FJ, Arguello H, Carvajal A, Rubio P. (2013) Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *Int J Env Res Public Health*. 10(5):1927-47.
- Alexandersen S, Zhang Z, Donaldson AI, Garland AJM. (2003) The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *J Comp Pathol*. 129(1):1-36.
- Bigras-Poulin M, Barfod K, Mortensen S, Greiner M. (2007) Relationship of trade patterns of the Danish swine industry animal movements network to potential disease spread. *Prev Vet Med*. 80(2-3):143-65.
- Dee S, Deen J, Rossow K, Wiese C, Otake S, Joo HS, Pijoan C. (2002) Mechanical transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus throughout a coordinated sequence of events during cold weather. *Can J Vet Res*. 66(4):232-9.
- Dee SA, Deen J, Otake S, Pijoan C. (2004a) An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs. *Can J Vet Res*. 68(2):128-33.
- Dee S, Deen J, Burns D, Douthit G, Pijoan C. (2004b) An assessment of sanitation protocols for commercial transport vehicles contaminated with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can J Vet Res*. 68(3):208-14.
- Gasparini S, Alborali GL, Pitozzi A, Guarneri F, Giacomini E, Baldo V, Scali F, Lazzaro M, Beatrice BM. (2017) Characterization of *Brachyspira hyodysenteriae* isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. *J Appl Microbiol*. 123(2):340-451.
- Giacomini E., Gasparini S., Lazzaro M., Scali F., Boniotti MB., Corradi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2018) The role of transportation in the spread of *Brachyspira hyodysenteriae* in fattening farms. *BMC Vet Res*. 2018 Jan 10;14(1):10.
- Lowe J, Gauger P, Harmon K, Zhang JQ, Connor J, Yeske P, Loula T, Levis I, Dufresne L, Main R. (2014) Role of transportation in spread of porcine epidemic diarrhea virus infection, United States. *Emerging. Infect Dis*. 20(5):872-4.
- Mirajkar NS, Gebhart CJ. (2014) Understanding the molecular epidemiology and global relationships of *Brachyspira hyodysenteriae* from swine herds in the United States: a multi-locus sequence typing approach. *PLoS One*. 9(9):e107176.
- Mirajkar NS, Phillips ND, La T, Hampson DJ, Gebhart CJ. (2016) Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *J Clin Microbiol*. 54(12):2942-9.
- Robertson ID, Mhoma JR, Hampson DJ. (1992) Risk factors associated with the occurrence of swine dysentery in Western Australia: results of a postal survey. *Aust Vet J*. 69(4):92-1.
- Smith RP, Cook AJC, Christley RM. (2013) Descriptive and social network analysis of pig transport data recorded by quality assured pig farms in the UK. *Prev Vet Med*. 108(2-3):167-77.
- Thakur KK, Revie CW, Hurnik D, Poljak Z, Sanchez J. (2016) Analysis of swine movement in four canadian regions: network structure and implications for disease spread. *Transbound Emerg Dis*. 63(1):e14-26.
- Willems H, Reiner GA. (2010) Multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 123(5-6):205-9.

**VALUTAZIONE DELLO STRESS DETERMINATO DALLA
MODALITÀ DI SOMMINISTRAZIONE DEL VACCINO IN
SUINETTI DI CIRCA TRE SETTIMANE DI VITA**

***EVALUATION OF DISTRESS IN THREE WEEKS OLD PIGLETS
IN RELATION TO THE ROUTE OF ADMINISTRATION
OF THE VACCINE***

MINERVINI S.¹, SCOLLO A.^{2,3}, CEVIDALLI, A.¹, BORTOLETTO G.¹, GOTTARDO F.²

¹ MSD, Animal Health, Italia; ² Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute,
Università degli Studi di Padova,

³ Libero Professionista Suivet

Parole chiave: benessere animale, vaccinazione, intradermica, suinetti

Key words: animal welfare, vaccination, intradermal, piglets

Riassunto: In medicina veterinaria non si può prescindere dal rispetto e miglioramento del benessere animale (BA) perciò si rende necessario valutare non solo l'efficacia tecnica di un dato intervento, ma anche il suo impatto sul BA. Lo studio ha inteso valutare i benefici in termini di BA della somministrazione del vaccino per *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 per via intradermica (ID) rispetto al metodo tradizionale intramuscolo con ago (IM). La ricerca ha utilizzato 106 suinetti in svezzamento (53 IM e 53 ID), su 18 suinetti/gruppo sono stati effettuati prelievi ematici per l'analisi del cortisolo mentre i rimanenti sono stati inclusi nei controlli comportamentali (4 sessioni di osservazioni di 40 min. a 0, 3, 24 e 48 h dalla vaccinazione). Su tutti i suinetti (106) sono stati effettuati dei filmati con registrazione audio al momento della vaccinazione per valutare le reazioni di fuga e le vocalizzazioni.

Le informazioni più rilevanti si sono ottenute dall'analisi video e audio dei filmati. Il 90% dei suinetti ID non ha manifestato alcuna reazione all'atto della vaccinazione vs il 55% del gruppo IM (P<0,001). Nel gruppo IM un 18% degli animali ha continuato ad agitarsi anche dopo la vaccinazione mentre per ID nessun suinetto ha manifestato questo comportamento (P<0,01). Nessuna vocalizzazione è stata emessa dal 55% dei suinetti ID vs il 25% del gruppo IM. Grida ripetute si sono registrate per il 50% dei suini IM e solo per il 13% degli ID (P<0,001).

Lo studio ha bene evidenziato il beneficio per il benessere del suino della vaccinazione intradermica senza ago in fase di inoculo. Merita un approfondimento la valutazione degli effetti positivi di ID sul comportamento dopo la vaccinazione e sul cortisolo, esiti che in questo studio sono emersi solo in modo tendenziale.

Abstract: In veterinary medicine, in order to address animal welfare (AW) issues, it is not sufficient to study only the technical effectiveness of a given intervention, but also to assess its impact on AW. The aim of the study was to evaluate the benefits in terms of AW of the intradermal administration (ID) of *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV2 vaccine compared to the traditional intramuscular needle method (IM). The research used 106 weaning piglets (53 IM and 53 ID), blood samples were taken from 18 piglets for each treatment group in order to perform the analysis of cortisol while the remaining were included in behavioral observations (4 sessions of observations of 40 min. at 0, 3, 24 and 48 h from vaccination). All piglets (106) were video and audio recorded at the time of vaccination to evaluate the flight reaction and the vocalizations.

The most relevant information was obtained from the video and audio analysis of the videos taken during vaccination. Ninety percent of ID piglets did not show any reaction at the time of vaccination vs 55% of the IM ones ($P<0.001$). In the IM group, 18% of the animals continued to be agitated after vaccination, while for ID no piglet showed this behavior ($P<0,01$). No vocalization was issued by 55% of ID piglets (25% of IM). Repeated screams were recorded for 50% of IM pigs and only for 13% of ID ($P<0.001$). The study has highlighted the benefit for the welfare of the pig of needle-free intradermal vaccination in the inoculation phase. The evaluation of the positive effects of ID on the behavior after vaccination and on cortisol is worth investigating, considering that in this study they emerged only tendentially.

INTRODUZIONE

Si stima che approssimativamente il 70% della popolazione di suini in allevamento sia vaccinata contro *Mycoplasma hyopneumoniae*, e forse una percentuale ancora maggiore sia vaccinata contro il PCV2. I vaccini attualmente disponibili sul mercato hanno dimostrato di essere efficaci nella riduzione dei sintomi clinici, della mortalità, delle lesioni polmonari e nel miglioramento delle performance degli animali in caso di infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* and PCV2 [1].

Negli ultimi anni è stata inoltre paragonata l'efficacia della vaccinazione convenzionale con ago per via intramuscolare con la più recente via di vaccinazione intradermica senza ago e uno studio [2] ha confermato che per entrambe le vie di vaccinazione, la risposta umorale sistemica, quella cellulo-mediata e quella locale sono ben stimolate.

Tuttavia, in risposta al crescente interesse dell'opinione pubblica che reputa gli animali esseri senzienti si rende necessario non solo studiare l'efficacia di un dato intervento, ma anche il suo impatto sul benessere animale. Il BA è argomento di grande attualità per tutto il comparto zootecnico e, per il suino, lo è in modo particolare.

Oltre alle tematiche generali, già da tempo oggetto di discussione, e trasversali a tutte le categorie di animali da reddito quali la disponibilità di spazio e le caratteristiche della pavimentazione, più recentemente il tema della riduzione del dolore legata alle mutilazioni zootecniche quali castrazione, taglio della coda e limatura dei denti ha acquisito notevole importanza. Su queste ultime problematiche sono stati pubblicati recentemente numerosi lavori [3], [4], [5]. Data la sensibilità manifestata dall'opinione pubblica, il tema della riduzione della sofferenza degli animali da reddito si sta estendendo anche ad altre pratiche, tra queste ci sono i trattamenti sanitari che prevedono l'uso dell'ago [6]. Questo studio ha quindi voluto valutare la risposta comportamentale e fisiologica dei suinetti al momento della somministrazione del vaccino per *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 mediante via intramuscolare con ago (gruppo IM) rispetto ad un sistema senz'ago per via intradermica (gruppo ID) estendendo i rilievi sperimentali ai giorni seguenti la vaccinazione.

MATERIALE E METODI

Lo studio si è svolto in una scrofaia a ciclo aperto della Provincia di Brescia, utilizzando 106 suinetti di età compresa tra le 3 e le 4 settimane. I suinetti da includere nello studio sono stati selezionati a 2 settimane di vita da 14 nidi di scrofe pluripare, scegliendo in ogni nidiata 3 o 4 suinetti per tesi (6/8 suinetti/scrofa) di peso simile (peso medio iniziale: 5,31 kg Gruppo IM e 5,38 kg gruppo ID). I suinetti sono stati identificati con marca auricolare di colore giallo per il gruppo IM (53 suinetti) e verde per il gruppo ID (53 suinetti). Nei due giorni seguenti gli animali sono stati svezzati e spostati in un locale svezzamento sito nella stessa scrofaia. Tutte le operazioni di selezione e marcatura degli animali da mettere in prova sono state effettuate circa 10 giorni prima della vaccinazione per evitare che lo stress legato a queste

pratiche potesse interferire con le rilevazioni di parametri fisiologici e comportamentali durante la prova. Nel locale svezzamento, gli animali dei due gruppi sperimentali sono stati mescolati ed egualmente ripartiti in 4 box con pavimentazione a grigliato di plastica, ventilazione artificiale ed alimentazione a secco a volontà. A circa 26 giorni di vita, gli animali sono stati vaccinati con la modalità prevista dal proprio gruppo sperimentale.

I suinetti appartenenti al gruppo ID sono stati vaccinati per *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 somministrando rispettivamente da un lato del collo 0,2 ml di Porsilis ® M Hyo ID Once (MSD Animal Health) e dall'altro lato 0,2 ml di Porcilis ® PCV ID (MSD Animal Health) entrambi inoculati per via intradermica impiegando due apparecchi per la vaccinazione senza ago IDAL™ (MSD Animal Health).

I suinetti appartenenti al gruppo IM sono stati vaccinati per gli stessi patogeni, come era già in uso fare l'azienda suinicola selezionata, somministrando sullo stesso lato del collo 2 ml di Stellamune One (Eli Lilly It. Spa Div. Elanco) e 2 ml di Suvaxyn PCV (Zoetis). Per la somministrazione è stata utilizzata una siringa multidose con doppio ago e doppio connettore in modo da inoculare entrambi i vaccini con un unico gesto. Gli aghi utilizzati erano di acciaio e avevano un calibro di 21 G e lunghezza di 16 mm, questi sono stati sostituiti ad ogni cambio di box di animali da vaccinare.

Rilievi sperimentali:

Tutti gli animali sono stati pesati individualmente in sala parto a due settimane dalla nascita (al momento del reclutamento), e di nuovo 48 ore dopo la vaccinazione.

Le rilevazioni comportamentali hanno previsto:

1. Al momento della vaccinazione, la realizzazione per tutti gli animali coinvolti nello studio di un filmato completo di audio per riprendere in dettaglio la reazione nel momento dell'incolo. Ogni filmato è stato successivamente analizzato da un osservatore che non aveva partecipato alla rilevazione in campo. Il rilevatore ha attribuito un punteggio alla reazione di fuga alla vaccinazione (0 = Rimane fermo e non necessita di sforzi per il contenimento; 1 = Si muove al momento della vaccinazione per poi tornare fermo; 2 = Continua ad agitarsi anche dopo la vaccinazione fino al riposizionamento a terra) e alle vocalizzazioni emesse (0 = Nessuna vocalizzazione o brevi grugniti; 1 = Grugnisce ripetutamente ed emette non più di un grido; 2 = Emette almeno due gridi).
2. Dopo la vaccinazione su 48 suinetti (24 per ciascun gruppo sperimentale) sono state effettuate ulteriori osservazioni comportamentali applicando l'*Istantaneous Scan Sampling* [7], il metodo prevede la registrazione ad intervalli di 5 minuti della posizione occupata da ciascun suinetto nel box (al centro del box sotto la lampada, ai lati del box vicino alla mangiatoia o in un angolo del box), se l'animale è isolato o, invece, è a contatto con i compagni ed, infine, l'attività svolta (riposa in decubito, è in piedi inattivo, è in piedi e svolge una qualche attività esplorativa o di gioco, mangia). Le osservazioni comportamentali della durata di 40 minuti si sono ripetute per 4 volte a 0, 3, 24 e 48 ore rispetto al momento della vaccinazione per valutare il comportamento tre giorni seguenti la vaccinazione. Il numero progressivo della marca auricolare di ciascun suinetto è stato trascritto con pennarello sulla schiena dell'animale al momento del contenimento per la vaccinazione. In questo modo si è facilitato il riconoscimento individuale dei soggetti da sottoporre ad osservazione senza che fosse necessario avvicinarsi agli animali e senza creare disturbo agli stessi. Le osservazioni comportamentali sono iniziate una volta completata la vaccinazione di tutti gli animali del box.

Il cortisolo plasmatico è stato misurato su campioni raccolti da 18 suinetti per tesi, utilizzando animali diversi da quelli reclutati per l'osservazione comportamentale per evitare che la manipolazione dovuta al prelievo ematico potesse influenzare il comportamento degli animali. I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena cava anteriore usando siringhe da 2.5 ml e poi conservati in provette senza anticoagulante. I prelievi sono stati effettuati 1 ora prima

della vaccinazione al fine di indentificare il livello basale individuale di ciascun soggetto e poi ripetuti 30 minuti e due ore dopo la vaccinazione.

I dati relativi alle reazioni di fuga e alle vocalizzazioni sono stati analizzati utilizzando il test di confronto per K proporzioni, i dati comportamentali sono stati analizzati mediante analisi della varianza usando un modello che ha considerato l'effetto del trattamento, della rilevazione e della relativa interazione. I dati del cortisolo sono invece stati elaborati applicando un modello per analisi ripetute e covariato per il valore basale di cortisolo.

RISULTATI

Le informazioni più rilevanti dello studio si sono ottenute dall'analisi dei video registrati durante la vaccinazione che hanno fatto emergere le maggiori differenze tra i due gruppi. Osservando i dati relativi alla reazione di fuga riportati in figura 1a si nota che il 90% dei suinetti del gruppo ID non ha manifestato alcuna reazione all'atto della vaccinazione contro il 55% di quelli del gruppo IM ($P<0,001$). Per quest'ultimo gruppo il 18% degli animali ha continuato ad agitarsi anche dopo la vaccinazione fino al riposizionamento a terra mentre nessuno dei suinetti ID ha manifestato questa risposta comportamentale ($P<0,01$). La figura 1b si riferisce alle vocalizzazioni emesse durante la vaccinazione e conferma quanto già osservato in termini di reazioni. Il 55% dei suinetti ID contro il 25% di quelli IM non ha emesso nessuna vocalizzazione ($P<0,008$) mentre grida ripetute si sono registrate per il 50% dei suini IM e solo il 13% degli ID ($P<0,001$). Per i restanti comportamenti osservati non si sono registrate differenze statisticamente significative come medie generali tra trattamenti, tuttavia per i comportamenti "in piedi e attivo a svolgere attività esplorative e/o di gioco" e "mangia" i valori registrati a tre ore dalla vaccinazione mostrano una tendenza statistica ($P=0,10$) e sono maggiori per il gruppo ID rispetto a quello IM. Relativamente al cortisolo, seppur in assenza di un pieno effetto della modalità di vaccinazione ($P=0,08$), per la somministrazione ID si registrano concentrazioni medie inferiori al netto dei valori basali registrati prima della vaccinazione. Per quanto riguarda pesi ed accrescimenti non si sono registrate differenze significative tra i 2 due gruppi.

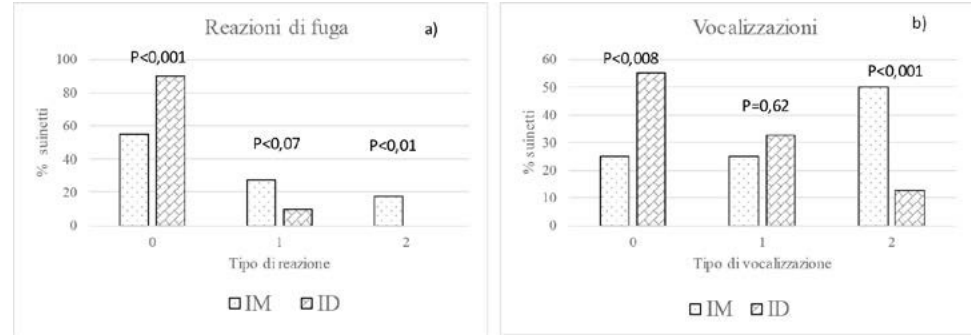


Figura 1 a) Reazioni di fuga dei suinetti al momento della vaccinazione (0 = Rimane fermo; 1 = Si muove al momento della vaccinazione per poi tornare fermo; 2 = continua ad agitarsi anche dopo la vaccinazione fino al riposizionamento a terra); 2 b) Vocalizzazioni emesse dai suinetti al momento della vaccinazione (0 = nessuna vocalizzazione o brevi grugniti; 1 = Grugnisce ripetutamente ed emette non più di un grido; 2 = Emette almeno due grida).

Figure 1 a) Flight reaction of piglets at the time of vaccination (0 = It remains still, 1 = It moves at the time of vaccination after which it remain still, 2 = It continues to fidget even after handling has ceased. Figure 1 b) vocalizations issued by piglets at the time of vaccination (0 = No vocalization or short grunts; 1 = repeated grunts and issues no more than 1 scream; 2 = Issues at least two screams).

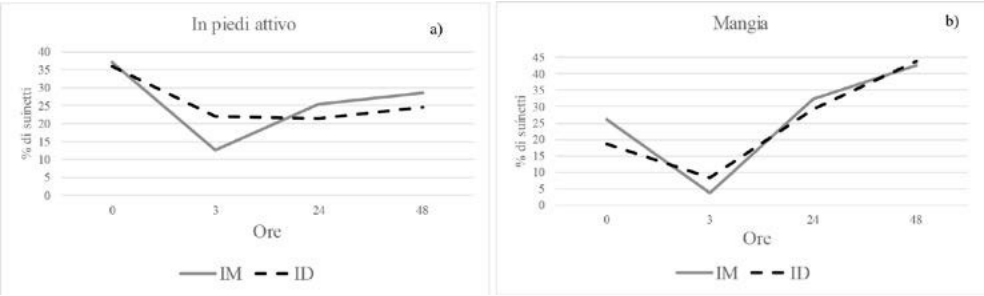


Figura 2 a) % di suinetti in piedi e attivi in diverse sessioni di osservazione; 2 b) % di suinetti che si stanno alimentando durante diverse sessioni di osservazione
Figure 2 a): % of piglets standing and active during different observation sessions; 2 b) % of piglets eating during different observation sessions

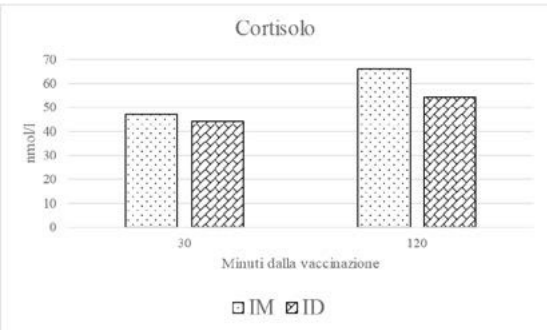


Figura 3: Concentrazione del cortisolo ematico
Figure 3: Blood concentration of cortisol

DISCUSSIONE

La vaccinazione rappresenta un fattore stressante per il suinetto sia perché richiede un parziale contenimento dell'animale sia per la fase di inoculo vera e propria. I dati raccolti in questo studio confermano per la vaccinazione l'esistenza di uno stress collegato principalmente alla modalità di inoculo del vaccino stesso. L'uso dell'ago provoca nella maggior parte dei soggetti una reazione di fuga e l'emissione di urla che sono associate a stati di ansia e dolore [8] intenso. Il presente studio dimostra come l'assenza di ago (vaccinazione ID) può in gran parte evitare questo stato di sofferenza. Relativamente alla durata dello stato di sconcerto, questa ricerca non sembra dare una indicazione definitiva sulle capacità di ripresa dei suinetti nei giorni successivi alla vaccinazione. La modalità di somministrazione del vaccino sembra invece influire chiaramente sul tempo di recupero. Infatti nell'osservazione fatta 3 ore dopo la vaccinazione i suinetti ID sembrano più motivati ad esplorare e ad alimentarsi. Questi comportamenti sono indicatori di una più veloce ripresa dopo la vaccinazione [9]. I dati medi del cortisolo e di comportamento sembrano indicare un minor stress del gruppo ID anche nel medio periodo.

CONCLUSIONI

Lo studio ha bene evidenziato il beneficio della vaccinazione intradermica in termini di

benessere soprattutto nel momento della somministrazione del vaccino. Questo beneficio è misurabile attraverso una ridotta manifestazione di comportamenti di fuga e una modesta produzione di vocalizzazioni di elevata intensità dei suini ID. Ulteriori approfondimenti per confermare i benefici della vaccinazione intradermica anche nel medio-lungo periodo sono auspicabili. In questo studio tali effetti sono emersi solo in modo tendenziale suffragati dalla manifestazione di comportamenti esplorativi, di ingestione e dai più bassi valori di cortisolo ematico.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Maes, D., Segales, J., Meyns, T., Sibila, M., Pieters, M., Haesebrouck, F., 2008. "Control of Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs". Vet. Microbiol. 126, 297–309.
- [2] Martelli, P., Cordioli P., Alborali L.G., Gozio S., De Angelis E., Ferrari L., Lombardi G., Borghetti P., 2007. "Protection and immune response in pigs intradermally vaccinated against Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) and subsequently exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain". Vaccine 25: 3400-3408.
- [3] Gottardo F., Scollo A., Contiero B., Ravagnani A., Tavella G., Bernardini D., De Benedictis G. M., Edwards S. A. (2016) "Pain alleviation during castration of piglets: a comparative study of different farm options". J. Anim. Sci. 94: 1-12.
- [4] Di Giminiani P., Brierley V. L. M. H., Scollo A., Gottardo F., Malcolm E. M. Edwards, S.A. Leach, M. C. (2016) "The Assessment of Facial Expressions in Piglets Undergoing Tail Docking and Castration: Toward the Development of the Piglet Grimace Scale" Frontiers in Vet. Sci. 3
- [5] Scollo A., Contiero B., Gottardo F. (2016) "Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170kg live weight". Vet. J. 207:92-98.
- [6] Sutherland M.A., (2015) "Welfare implications of invasive piglet husbandry procedures, methods of alleviation and alternatives: a review", New Zealand Vet. J. Vol. 63, 1-17.
- [7] Martin, P., Bateson, P., 1993. Measuring Behaviour, an Introductory Guide. Cambridge University Press, Cambridge.
- [8] Weary D.M., Braithwaite L.A., Fraser D. (1998) "Vocal response to pain in piglets". App. Anim. Behav. Sci. 56: 161-172.
- [9] Leslie E., Hernández-Jover M., Newman R., Holyoake P., (2010) Assessment of acute pain experienced by piglets from ear tagging, ear notching and intraperitoneal injectable transponders. Appl. Anim. Behav. Sci. 127, 86-95.

PREVEDERE IL RISCHIO DI MORSICATURA DELLA CODA USANDO L'ANALISI DEL CLASSIFICATION AND REGRESSION TREE

TO PREDICT TAIL BITING RISK IN PIG FARMS USING CLASSIFICATION AND REGRESSION TREE ANALYSIS

SCOLLO A.¹, GOTTARDO F.², CONTIERO B.², EDWARDS S.A.³

¹ Medico Veterinario, Swivet Research snc; ² Università degli Studi di Padova; ³ Università degli Studi di Newcastle

Parole chiave: Suino, morsicatura della coda, analisi del rischio, fattori di rischio
Key words: Swine, tail biting, risk analysis, risk factors

Riassunto: La morsicatura della coda è stato identificato come un problema comportamentale, di benessere ed economico nel settore suinicolo, e richiede appropriati quanto spesso difficili interventi gestionali in azienda. Lo scopo del presente lavoro è quello di introdurre la metodologia di analisi della *Classification* e *Regression Tree* nel tentativo di sviluppare uno strumento di prevenzione per fenomeni acuti di morsicatura della coda nel suino. È stato coinvolto un campione di 60 aziende commerciali destinate alla produzione del suino pesante; una visita in allevamento e una intervista con l'allevatore sono state alla base della raccolta dati relativi va alla management generale, alla salute dell'allevamento, alla prevenzione delle patologie, al controllo del microclima, all'alimentazione e alla produzione. I risultati suggeriscono che questo approccio statistico può essere d'aiuto per prevedere il rischio di osservare morsicatura della coda in azienda, con una sensibilità dell'86,7% per il *Classification Tree* e una correlazione di 0,7 tra la prevalenza prevista e quella osservata con il *Regression Tree*. L'analisi ha fatto emergere 5 principali variabili predittive di morsicature alla coda (densità di allevamento, livelli di ammoniaca, numero di suini per addetto, tipo di pavimentazione, e puntualità nella distribuzione dell'alimento), ognuna delle quali di importanza differente a seconda del sottogruppo di animali considerato. Il modello potrebbe avere un'affidabile e pratica applicazione del supporto e nel miglioramento degli interventi di prevenzione della morsicatura della coda, specialmente nel caso di sottogruppi di animali ad elevato rischio, allevatore veterinari a valutare quanto le proprie condizioni siano predisponenti al problema.

Abstract: Tail biting in pigs has been an identified behavioural, welfare and economic problem for decades, and requires appropriate but sometimes difficult on-farm interventions. The aim of the paper is to introduce the *Classification* and *Regression Tree* (CRT) methodologies to develop a tool for prevention of acute tail biting lesions in pigs on farm. A sample of 60 commercial farms rearing heavy pigs were involved; an on-farm visit and an interview with the farmer collected data on general management, herd health, disease prevention, climate control, feeding and production traits. Results suggest a value for the CRT analysis in managing the risk factors behind tail biting on a farm-specific level, showing 86.7% sensitivity for the *Classification Tree* and a correlation of 0.7 between observed and predicted prevalence of tail biting obtained with the *Regression Tree*. CRT analysis showed five main variables (stocking density, ammonia levels, number of pigs per stockman, type of floor and timeliness in feed supply) as critical predictors of acute tail biting lesions, which demonstrate different importance in different farms subgroups. The model might have reliable and practical

applications for the support and implementation of tail biting prevention interventions, especially in case of subgroups of pigs with higher risk, helping farmers and veterinarians to assess the risk in their own farm and to manage their predisposing variables in order to reduce acute tail biting lesions.

INTRODUZIONE

La morsicatura della coda è un problema riconosciuto da decenni nell'allevamento del suino, in particolare da quando l'industrializzazione dei settori produttivi ha trasformato quello che una volta era un allevamento rurale ad un allevamento spintamente intensivo. L'aumento delle densità, l'impoverimento degli ambienti di allevamento e la crescente presenza di elementi stressanti hanno portato all'aumento della frequenza di fenomeni di cannibalismo tra gli animali, con importanti perdite economiche per gli allevatori dovute ai ridotti incrementi ponderali, la maggiore suscettibilità alle infezioni secondarie, maggiore uso degli antibiotici e cali della resa economica al macello causati da rifilature obbligate della carcassa ed a volte anche della completa distruzione di quest'ultima (Schröder-Petersen and Simonsen, 2001). Per questo motivo, storicamente la coda del suino è sempre stata tagliata in tenera età per ridurre il più possibile il rischio di lesioni. Tuttavia, l'argomentazione ad oggi più discussa a proposito di questa pratica è quella legata certamente alla riduzione del benessere del suino, che manifesta la propria incapacità di integrarsi correttamente con le sue condizioni di allevamento tramite nervosismo ed aggressività. Il peso che ha assunto negli ultimi anni il benessere degli animali, ed in particolare il taglio della coda, è sottolineato dalla presenza di una legislazione europea ad esso dedicata ed aggiornata nel 2011 con Decreto italiano (D. Lgs. 122 del 2011) a decorrenza dal primo gennaio 2013. A fornire ulteriore importanza all'argomento, c'è la forte spinta dell'opinione pubblica e del consumatore, che esprimono la loro voce con le proprie scelte sui banchi del supermercato fino ad arrivare a sempre più frequenti campagne di sensibilizzazione mediatica. Partendo da questi presupposti, sono sempre di più le realtà zootecniche nell'Unione Europea che decidono di porre fine alla pratica del taglio della coda, ed ormai anche in Italia c'è chi comincia ad approcciare alla scelta. Questo comporta però non poche problematiche legate alla gestione della coda lunga mantenendo intensivo il sistema di allevamento. Sono numerosissimi gli studi condotti in tutta Europa che hanno evidenziato la multifattorialità del comportamento di morsicatura (Edwards, 2006). Cosa significa multifattorialità? Significa che i fattori scatenanti il problema sono molteplici, e spaziano dal management, al microclima, alla densità, allo stato sanitario ecc., complicando molto le possibilità di controllo. Per quanto sia disponibile dall'anno scorso una lista di fattori di rischio evidenziati nello specifico caso del suino pesante italiano (Scollo et al., 2016), permane la difficoltà per le singole aziende suinicole di individuare la propria predisposizione a presentare fenomeni di cannibalismo, e conseguentemente a quantificare il rischio che si corre interrompendo il taglio della coda. Con l'intento di creare uno strumento utile a dare consapevolezza agli allevatori dei propri rischi aziendali e ad orientare la scelta verso l'interruzione del taglio della coda oppure temporaneamente rimandare, il presente lavoro ha utilizzato un modello statistico già noto in medicina umana ma fino ad ora mai utilizzato in zootecnia, la *Classification and Regression Tree Analysis*, tramite il quale è stato creato un diagramma di flusso in grado di tradurre in modo estremamente pratico e facile il rischio ipotetico di un'azienda.

MATERIALI E METODI

Il campione di aziende utilizzato per l'analisi statistica è stato quello già a sua volta utilizzato per l'analisi dei fattori di rischio da Scollo et al. (2016). Si trattava di un data-set

contenente informazioni dettagliate su strutture, management, stato sanitario e ambiente di 67 tra svezzamenti e ingrassi localizzati nel Nord Italia. Tutte le aziende coinvolte nello studio allevavano suini per la produzione dei prosciutti dei circuiti DOP. Il durante la raccolta dati del 2016, tutte le aziende erano state contattate telefonicamente e sottoposte ad un questionario, per poi essere anche visitate da un ricercatore per la verifica della raccolta dati aziendali e per la rilevazione strumentale della qualità dell'aria. Durante la visita in azienda, il numero di suini con lesioni alla coda è stato registrato in tutti i box. Sebbene non sia stato possibile identificare tutte le lesioni lievi sviluppatesi durante l'intero ciclo, va considerato che le lesioni gravi sono visibili anche molto tempo dopo la loro insorgenza (Smulders et al., 2008). Il numero di lesioni è stato registrato con un metodo binomiale, includendo anche i graffi superficiali della coda con presenza di sangue e code con perdite di tessuto.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stato adottato l'approccio del *Classification and Regression Tree* (Breiman et al., 1984), utilizzando due modelli che prendessero in considerazione l'uno il rischio di presenza o assenza di lesioni alla coda (analisi CTA), l'altro la prevalenza degli animali con lesione (analisi RTA). Per entrambe le analisi, sono state valutate un totale di 24 variabili predisponenti alla morsicatura della coda selezionate tra quelle raccolte tramite il questionario. Inoltre, per la validazione del test è stato utilizzato un data set aggiuntivo composto dai dati raccolti da ulteriori 25 aziende, in modo da poter anche calcolare la sensibilità e la specificità del test. Per entrambi i grafici ottenuti dall'analisi, i nodi decisionali posizionati più in alto hanno importanza maggiore rispetto a quelli che appaiono alla base dell'albero. Ulteriori dettagli sull'analisi statistica sono forniti da Scollo et al. (2017).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La *Classification and Regression Tree Analysis* è un'analisi statistica che valuta le possibili interazioni esistenti tra diversi fattori di rischio per un problema, ed è utilizzata nel campo della medicina umana per valutare il rischio di contrarre o manifestare patologie con complesse interazioni causali, come nel caso del rischio di cancro al colon, allo stomaco o ai polmoni. Per esempio, è noto come l'essere un fumatore, l'essere un paziente anziano e il fare poca attività fisica siano tutti fattori di rischio per l'insorgenza di tumore. Tuttavia, qual è il reale rischio che un paziente con solo due di questi tre fattori si ammali in un breve periodo? È chiaro che una risposta a questa domanda può aiutare il medico a fare le scelte giuste nella prevenzione o nella prognosi. Allo stesso modo, poter rispondere alla domanda "qual è il rischio che un'azienda suinicola sviluppi fenomeni di cannibalismo alla coda?" può aiutare a scegliere se si è pronti a provare ad interrompere il taglio della coda oppure è il caso di temporeggiare dando invece priorità alla messa in atto di interventi correttivi dell'attuale stato di benessere. La differenza tra la *Classification* e la *Regression Tree Analysis* è nel tipo di rischio che viene calcolato, creando due differenti diagrammi di flusso:

- *Classification Tree Analysis*: Qual è il rischio che almeno uno dei suini in una data azienda presenti la morsicatura alla coda?

- *Regression Tree Analysis*: Nel caso l'azienda sia a rischio morsicatura, qual è la percentuale di animali che potrebbero presentare il problema?

L'importante premessa da fare su questo strumento è di non affidarsi ciecamente al risultato ottenuto, perché le variabili che la statistica non ha potuto considerare sono purtroppo diverse (es. la presenza di arricchimenti ambientali, la stagione, la genetica...). Va invece

utilizzato come strumento orientativo che evidenzia i punti critici aziendali che vanno certamente corretti prima di approcciare alla delicata scelta di non tagliare più le code. Si consiglia sempre di confrontarsi con il proprio veterinario aziendale.

La *Classification Tree Analysis* è stata in grado di classificare correttamente dal 70 all'86,7% dei casi (considerando rispettivamente il test di valutazione e il data set originale), mostrando un'alta efficienza. Tra le 24 variabili utilizzate nell'analisi, quattro (densità, livelli di ammoniaca, numero di suini per addetto e puntualità nella distribuzione del pasto) sono emersi sia nella *Classification* che nella *Regression* analisi. Nella CTA, la densità di allevamento è stata la prima variabile a determinare una ripartizione del rischio (Fig. 1).

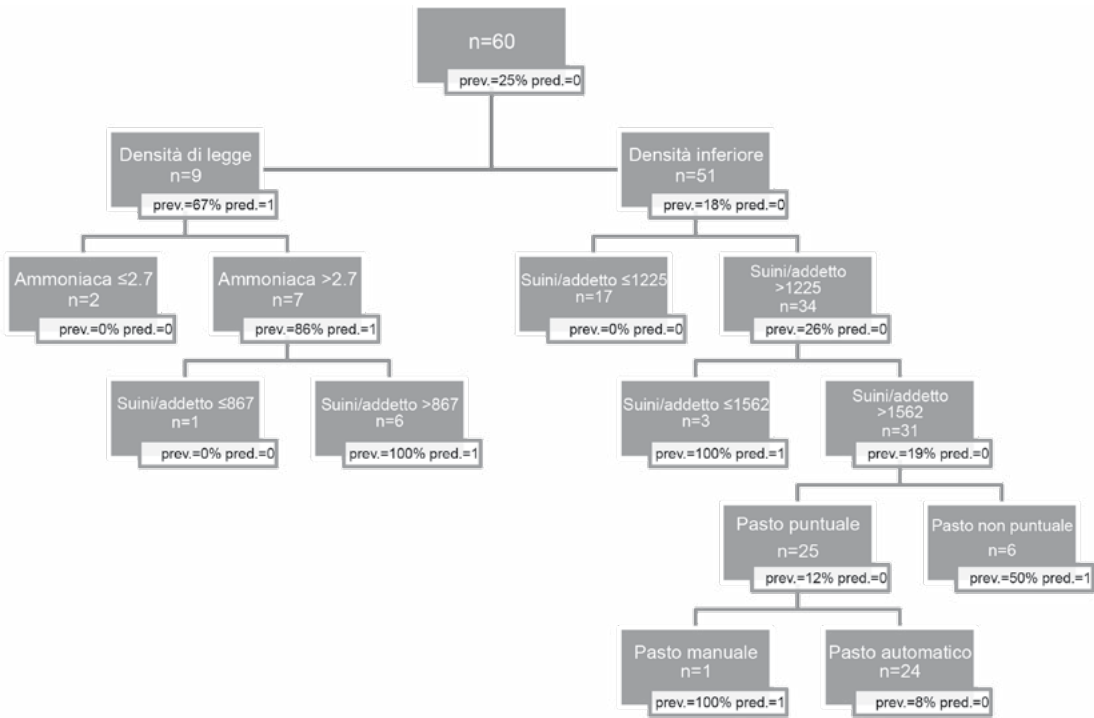


Figura 1. Il *Classification Tree* utilizzato per prevedere il rischio di insorgenza di morsicatura nel suino pesante. Modificato da Scollo et al. (2017).
N = numero di aziende presenti nel sottogruppo;
Prev.= prevalenza di aziende nel sottogruppo con almeno un caso di lesioni alla coda;
Pred.= predicted value (0=assenza di morsicatura; 1=presenza di morsicatura); quando la prevalenza è > 50% pred.=1.

Figure 1. Classification tree used to predict the risk of tail biting occurrence in heavy pigs. Modified from Scollo et al. (2017).
N =number of farms per subgroup;
Prev.= percentage of farms in the node with presence of tail biting;
Pred.= predicted value (0 =no tail biting; 1= presence of tail biting); when the percentage of farms with tail biting in the node is >50%, pred.=1.

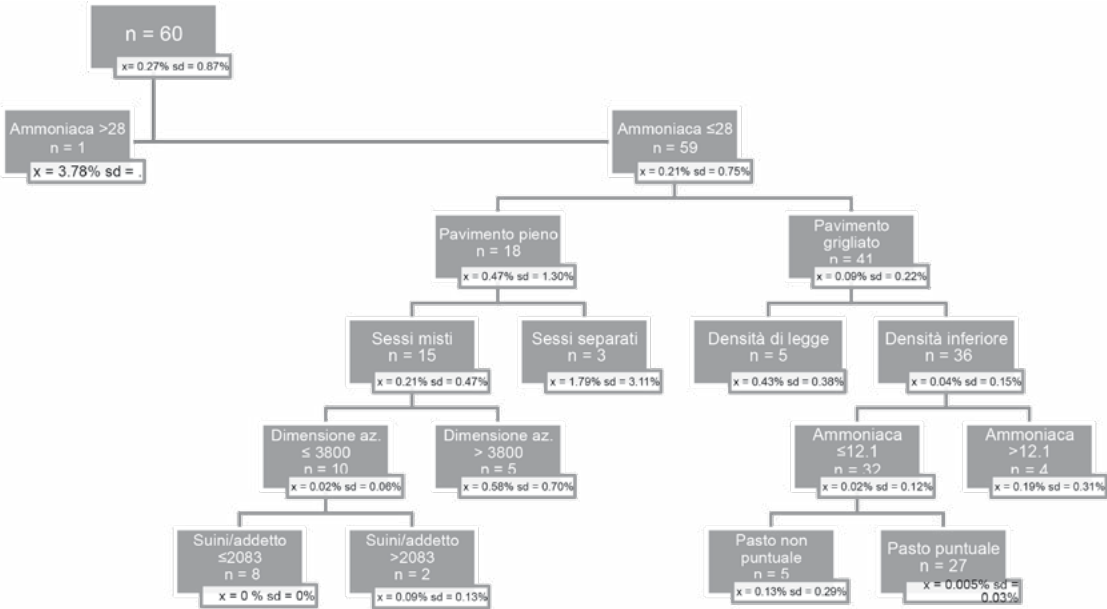


Figura 2. Il *Regression Tree* utilizzato per prevedere la prevalenza di lesioni alla coda in aziende suinicole che allevano suino pesante. Modificato da Scollo et al. (2017).
N = numero di aziende presenti nel sottogruppo;
x = prevalenza media di suini con lesioni alla coda;
sd = deviazione standard.

Figure 2. Regression tree used to predict the prevalence of tail bitten pigs in heavy pigs farms. Modified from Scollo et al. (2017).
N =number of farms;
x =mean prevalence of affected animals;
sd =standard deviation of prevalence of affected animals.

In accordo con studi storici (Schröder-Petersen and Simonsen, 2001; Moinard et al., 2003), il risultato indica che la non osservanza delle norme minime sulla densità di allevamento richieste dalla legge dà un contributo fondamentale all'insorgenza di morsicatura della coda. Chiaramente, questo acquista maggiore importanza nel suino pesante, considerando che la legislazione europea prescrive precise densità solo fino alla fascia di peso di 110 kg, oltre la quale non vi è più la richiesta di alcun aumento di spazio per capo. I livelli di ammoniaca, emersi come fattori di rischio già nello studio di Scollo et al. (2016), sono un ulteriore fattore discriminante tra aziende problema ed aziende con minore pericolo di morsicatura della coda. Anche Smith et al. (1996) and Wathes et al. (2000) descrissero l'ammoniaca come un gas nocivo in grado di indurre stress e conseguentemente anche comportamenti aberranti nel suino, inclusa la morsicatura della coda. Anche se questa variabile è stata selezionata al secondo nodo dell'albero del CTA, con un elevato rischio di essere un'azienda problema in caso di elevata densità e più di 2,7 ppm di ammoniaca nell'aria, la variabile ha dimostrato di essere la prima per importanza nell'influenzare la prevalenza delle lesioni alla coda in caso di livelli superiori a 28 ppm (Fig. 2). Il numero di suini per addetto è rientrato nell'albero del CTA al terzo nodo, suggerendo una stretta

relazione tra l'insorgenza di morsicatura e la capacità o possibilità di prendersi cura degli animali. Un'ipotesi simile era già stata formulata nel 2003 da Moinard e colleghi. Il coinvolgimento nella capacità di prendersi cura degli animali è un importante fattore per il benessere anche secondo Willgert et al. (2014), che osservarono l'aumento di zoppie solo nelle aziende a media produttività, ma non in quelle a bassa o elevata produzione. Anche nel presente studio è interessante notare che, in caso di densità di allevamento inferiore rispetto agli standard di legge, le aziende a rischio siano solo quelle che hanno più di 1225 ma meno di 1562 suini seguiti dallo stesso addetto. Questo potrebbe confermare quanto già suggerito da Willgert et al. (2014), selezionando una fascia critica di allevamenti che, per il loro livello tecnologico o di meccanizzazione, si collocano nel mezzo tra le aziende seguite da allevatori che si dedicano a pochi suini e riescono a gestirne ottimamente il management, e le aziende estremamente moderne dove il personale tecnico è estremamente specializzato e in grado di gestire anche un numero elevato di animali.

Anche la puntualità nella distribuzione dell'alimento è una variabile emersa in entrambi gli alberi decisionali. Il risultato è facilmente spiegabile con il comportamento di attesa ed anticipazione dell'arrivo del pasto che è stato già osservato da altri autori: il prolungamento dell'attesa può aumentare la frustrazione dell'animale e portarlo a re-dirigere il proprio nervosismo verso i propri compagni di box, potenzialmente sviluppando fenomeni di cannibalismo (Robert et al., 1991; Paul et al., 2007).

Le variabili legate al tipo di pavimentazione, alla presenza di sessi misti nei box e alla dimensione aziendale sono entrate invece solo nell'albero RTA, ovvero quello relativo alla percentuale animali a rischio lesioni all'interno della stessa azienda. Il tipo di pavimentazione è stato descritto già da altri autori come fattore potenzialmente stressante per gli animali; sebbene spesso si è riportato in bibliografia il pavimento a grigliato come quello meno idoneo per il benessere animale, nel presente lavoro è stato il pavimento pieno a determinare il rischio maggiore di una elevata prevalenza di morsicature. Probabilmente, come descritto anche nel 2001 da Schröder-Petersen and Simonsen, il pavimento pieno consente al liquame di stagnare a contatto con gli animali predisponendo all'elevata concentrazione di gas dannosi come l'ammoniaca, oltre che a aumentare la scivolosità del suolo con conseguente difficoltà interazione gerarchica tra gli animali. Inoltre, essendo lo studio stato condotto durante la stagione estiva, le condizioni climatiche potrebbero avere esacerbato queste condizioni. Per quanto riguarda il sesso invece, le opinioni in bibliografia sono spesso contrastanti. Considerando il suino pesante, Scollo et al. (2013, 2016) non trovarono nessuna influenza del sesso sulla prevalenza di lesioni alla coda. Tuttavia nel presente lavoro emerge che una maggiore prevalenza di lesioni si sviluppi nei sottogruppi di animali allevati a sessi separati (1,8%) piuttosto che a sessi misti (0,2%), in accordo con quanto già osservato da Zonderland et al. (2010). Un'altra variabile che sembra influenzare la prevalenza di lesioni alla coda è la dimensione aziendale, per cui sembrano più predisposte al cannibalismo le aziende con più di 3800 suini, in accordo con Chambers et al. (1995) e osservò come la probabilità di morsicatura della coda crescesse con la dimensione dell'allevamento.

Questo modello statistico fornisce delle informazioni aggiuntive utili alla comprensione della complessa interazione tra i diversi fattori di rischio, suggerendo che alcuni di essi hanno un'importanza relativa a seconda del sottogruppo di animali in cui sono presenti. Per quanto gli alberi decisionali ottenuti dal presente dal lavoro abbiano il limite di essere stati calcolati su un campione rappresentativo ma non amplissimo della panoramica italiana, e di non aver potuto considerare alcuni fattori di rischio come gli arricchimenti ambientali a causa della scarsissima variabilità presente nel campione, l'approccio si può considerare efficace ed innovativo. Inoltre l'analisi fornisce l'evidenza che la morsicatura della coda è

probabilmente il risultato della co-presenza di molti fattori di rischio che, operando insieme, rendono alcune aziende più suscettibili di altre al problema; contemporaneamente lo strumento può essere di aiuto nella pratica per un primo screening aziendale personalizzato del rischio di morsicatura alla coda.

BIBLIOGRAFIA

- Breiman, L., Friedman, J.H., Olshen, R.A., Stone, C.J., 1984. Classification and Regression Tree, second edn. Wadsworth, Pacific Grove, CA.
- Chambers, C., Powell, L., Wilson, E., Green, L.E., 1995. A postal survey of tail biting in pigs in south west England. *Vet. Rec.* 136, 147–148.
- Edwards, S.A., 2006. Tail biting in pigs: understanding the intractable problem. *Vet. J.* 171, 198–199.
- Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J., Green, L.E., 2003. A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 333–355.
- Paul, E.S., Moinard, C., Green, L.E., Mendl, M., 2007. Farmers' attitudes to methods for controlling tail biting in pigs. *Vet. Rec.* 160, 803–805.
- Robert, S., Matte, J.J., Girard, C.L., 1991. Effect of feeding regimen on behavior of growing–finishing pigs supplemented or not supplemented with folic-acid. *J. Anim. Sci.* 69, 4428–4436.
- Schröder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., 2001. Tail biting in pigs. *Vet. J.* 162, 196–210.
- Scollo, A., Contiero, B., Gottardo, F., 2016. Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight. *Vet. J.* 207, 92–98.
- Scollo, A., Gottardo, F., Contiero, B., Edwards, S.A., 2017. A cross-sectional study for predicting tail biting risk in pig farms using classification and regression tree analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 146 (2017) 114–120.
- Scollo, A., Di Martino, G., Bonfanti, L., Stefani, A.L., Schiavon, E., Marangon, S., Gottardo, F., 2013. Tail docking and the rearing of heavy pigs: the role played by gender and the presence of straw in the control of tail biting Blood parameters, behaviour and skin lesions. *Res. Vet. Sci.* 95, 825–830.
- Smith, J.H., Wathes, C.M., Baldwin, B.A., 1996. The preference of pigs for fresh air over ammoniated air. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 49, 417–424.
- Smulders, D., Hautekiet, V., Verbeke, G., Geers, R., 2008. Tail and ear biting lesions in pigs: an epidemiological study. *Anim. Welf.* 17, 61–69.
- Wathes, C.M., Jones, J.B., Kristensen, H.H., Jones, E.K.M., 2000. Aversiveness of atmospheric ammonia to pigs and domestic fowl. In: Proceedings of the Annual International Meeting of American Society of Agricultural Engineers. Milwaukee, Wisconsin, USA.
- Willgert, K.J., Brewster, V., Wright, A.J., Nevel, A., 2014. Risk factors of lameness in sows in England. *Prev. Vet. Med.* 113, 268–272.
- Zonderland, J.J., Bracke, M.B., den Hartog, L.A., Kemp, B., Spoolder, H.A., 2010. Gender effects on tail damage development in single-or mixed-sex groups of weaned piglets. *Livest. Sci.* 129, 151–158.

**PERSISTENZA AMBIENTALE DI SALMONELLA E RUOLO
DEGLI UCCELLI SELVATICI NELL'EPIDEMIOLOGIA
DELL'INFEZIONE IN ALLEVAMENTI DI SUINI ALL'APERTO
NEL REGNO UNITO**

***PERSISTENCE OF SALMONELLA IN THE ENVIRONMENT AND
THE ROLE OF WILD BIRDS IN THE EPIDEMIOLOGY OF
INFECTION IN AN OUTDOOR PIG FARM IN THE UNITED
KINGDOM***

DE LUCIA A.^{1,2}, RABIE A.², SMITH R.P.³, DAVIES R.², OSTANELLO F.¹, MARTELLI F.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy; ²Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK; ³Animal and Plant Health Agency (APHA) Department of Epidemiological Sciences, UK

Parole chiave: *Salmonella*, prevalenza, uccelli selvatici, allevamento di suini all'aperto
Key Words: *Salmonella*, prevalence, wild birds, outdoor farm pigs

Riassunto: Questo studio si propone di investigare il ruolo degli uccelli selvatici nell'epidemiologia della *Salmonella* in un allevamento di suini all'aperto e valutare la persistenza di *Salmonella* nell'ambiente. Tre visite di campionamento sono state effettuate in un allevamento di suini all'aperto composto da tre lotti diversi di terreno (campi). Due dei campi erano vuoti da 2 e 3 anni mentre il terzo era ancora occupato da suini solo durante la prima visita. Campioni ambientali e campioni di feci provenienti da suini, uccelli e animali selvatici, sono stati testati per la presenza di *Salmonella*. I risultati ottenuti indicano che *Salmonella* è in grado di sopravvivere nell'ambiente per diversi anni, supportando l'ipotesi che l'ambiente possa fungere da serbatoio per l'infezione. È interessante notare che la prevalenza di feci di uccelli selvatici positive per *Salmonella* è aumentata nel tempo, passando dal 7,4% della prima visita al 24,6% e 44,3% rispettivamente alla seconda e terza visita. I livelli di *Salmonella* identificati in alcuni dei campioni fecali di uccelli selvatici erano insolitamente alti ($10^5 - 10^6$ CFU/g) suggerendo che nel tratto gastrointestinale di questi uccelli, *Salmonella* stava attivamente replicando. *Salmonella* monofasica Typhimurium DT 193 è risultato essere il sierotipo più frequentante isolato, anche nelle feci degli uccelli, suggerendo che i suini siano la fonte iniziale di infezione, essendo questo sierotipo tipicamente associato all'allevamento del suino.

Abstract: The aims of this study were to investigate the role of wild birds in the epidemiology of *Salmonella* in one outdoor pig farm and the persistence of *Salmonella* in the environment. Three sampling visits were carried out in a pig farm consisting of three fields. Two of the fields had been empty of pigs for 2 and 3 years respectively and the third was occupied by pigs during the first visit only. In total, 682 faeces samples from wild animals, birds and pigs, and environmental samples were tested for the presence of *Salmonella* and 42% of them resulted positive. Our results showed that *Salmonella* has a great ability to survive in the environment for several years, supporting the hypothesis that the environment can act as a reservoir for the infection. Interestingly, the proportion of *Salmonella* positive wild bird droppings increased over time with 7.4%, 24.6% and 44.3% at the first, second and third visit, respectively. *Salmonella* levels identified in some of the wild bird droppings were unusually high ($10^5 - 10^6$ CFU/g) and suggested that *Salmonella* was actively replicating in the gastrointestinal tract of these birds. Monophasic *Salmonella* Typhimurium DT

193 was the predominant serotype isolated, even in wild bird droppings, suggesting that the pigs are the original source of infection, as this serovar is typically associated with pig production.

INTRODUZIONE

La salmonellosi, considerando sia il numero di casi di malattia sia il tasso di ospedalizzazione, rappresenta un importante problema di sanità pubblica tanto da essere considerata la seconda tossinfezione alimentare più frequente dei paesi industrializzati (EFSA 2016). Trattandosi di un microrganismo ubiquitario e trasmissibile da numerose specie animali, l'infezione da *Salmonella* può essere introdotta nell'allevamento di suini tramite numerose vie. In particolare, per le aziende all'aperto e per quelle biologiche, la fauna selvatica, gli animali sinantropici e domestici che vivono in azienda svolgono un ruolo rilevante in quanto possono costituire una fonte di introduzione e trasmissione di *Salmonella* mediante il contatto diretto con i suini o indirettamente attraverso la contaminazione fecale di mangimi, abbeveratoi o attrezzature (Zheng et al., 2007).

Al fine di comprendere meglio il ruolo degli uccelli selvatici nel ciclo d'infezione da *Salmonella* nei suini, sono stati condotti numerosi studi, e diversi fagotipi di *S. Typhimurium* sono stati associati agli uccelli selvatici (Andres e Davies, 2015; Zheng et al., 2007, Pennycott et al., 2006). Nel Regno Unito, *S. Typhimurium* (DT) 56, 40, 41, 195 è stata isolata da fringuelli, uccelli acquatici, passeri domestici, cornacchie, verdoni e gabbiani. *S. Typhimurium* DT2 e DT99 sono state associate ai piccioni mentre DT8 e DT30 a uccelli selvatici (Pennycott et al., 2006). Secondo i dati pubblicati dall'Animal and Plant Health Agency (APHA) sull'isolamento di *Salmonella* da suini in Gran Bretagna tra il 2011 e il 2015, solo lo 0,3% degli isolati erano ceppi di *Salmonella* associati a uccelli selvatici suggerendo quindi che gli uccelli non costituiscano un serio rischio per i suini (APHA, 2017). Altri autori, sebbene attribuiscono agli uccelli selvatici un ruolo nella ri-circolazione dell'infezione di *Salmonella*, sono meno propensi ad identificarli come possibile fonte di introduzione del patogeno in azienda (Andrés et al., 2013). In ogni caso la presenza di uccelli selvatici, ratti e topi è di particolare importanza nell'allevamento del suino all'aperto dove essi possono rappresentare un fattore di rischio per la sieropositività da *Salmonella* e dove le misure di controllo e biosicurezza sono più difficile da attuare (Andres & Davies, 2015). Nel Regno Unito, l'allevamento estensivo è molto diffuso: circa il 40% dei riproduttori è allevato all'aperto, mentre le fasi di magronaggio e ingrasso sono realizzate prevalentemente al chiuso (Houston, 2013).

Nel presente studio è stato valutato il possibile ruolo degli uccelli selvatici nell'epidemiologia della *Salmonella* in un allevamento di suini all'aperto in Inghilterra. Contestualmente è stata investigata la persistenza e la capacità di *Salmonella* di sopravvivere nell'ambiente esterno.

MATERIALI E METODI

Prelievo dei campioni

Tra settembre e novembre 2015, sono state effettuate tre visite di campionamento in un allevamento di suini all'aperto. La prima visita è stata effettuata quando i suini erano ancora presenti, mentre le due successive sono state effettuate dopo l'invio degli animali al macello, con un intervallo di un mese l'una dall'altra. L'azienda consisteva in tre lotti di terreno (campi), due dei quali erano vuoti, rispettivamente, da 2 (campo 1) e da 3 (campo 2) anni, mentre il terzo campo (campo 3) era occupato da suini, in fase di svezzamento e magroni, solamente al momento della prima visita. Adiacente all'allevamento, c'era un corso d'acqua, popolato da un gran numero di uccelli acquatici selvatici. Durante le tre visite, da ciascun campo sono stati prelevati i seguenti campioni ambientali: suolo e acqua da pozzanghere, feci di animali selvatici (uccelli, volpi e conigli), feci dei suini (Tabella 1). I campioni sono stati raccolti in contenitori di plastica sterili. Per la raccolta

dei campioni di superficie è stata utilizzata una garza sterile imbevuta di acqua peptonata che è stata strofinata sulle superfici ambientali, sulle attrezzature e sui recinti dei suini e successivamente immersa in 225 ml di Buffered Peptone Water (BPW). La tipologia e la numerosità dei campioni di feci di animali selvatici raccolti nel corso di ciascuna delle tre visite è stata variabile in quanto dipendente dalla loro presenza e disponibilità.

Esame colturale per la ricerca di *Salmonella* spp.

L'isolamento di *Salmonella* è stato effettuato mediante i quattro passaggi di pre-arricchimento, arricchimento, isolamento e identificazione previsti dalla norma ISO6579-1: 2017. Le colonie sospette sono state identificate mediante sierotipizzazione completa secondo lo schema di Kaufmann-White-Le Minor (Grimont & Weill, 2007) e, su una selezione dei ceppi di *S. Typhimurium* e della sua variante monofasica (mST), è stato determinato anche il fagotipo (Anderson et al., 1977). Infine, da 10 campioni di feci raccolti da ciascuna classe di età dei suini (svezzamento e magronaggio) e, ove possibile, su campioni ambientali, mediante diluizioni decimali e successiva coltura di ciascuna diluizione, come sopra riportato, è stato stimato semi-quantitativamente il livello di *Salmonella* per grammo di campione (Wales et al., 2006).

Analisi statistica

Sono state valutate eventuali differenze della prevalenza di *Salmonella* considerando sia tutti i campioni prelevati dai tre campi sia i soli campioni fecali di uccelli selvatici. I confronti sono stati condotti sia considerando singolarmente i risultati di ciascuno dei tre campi sia raggruppando i risultati dei campi 1+2 (assenza di suini in tutte le visite) e confrontandoli con quelli del campo 3 (ancora occupato da suini durante la prima visita). Per i confronti è stato utilizzato il test Chi-quadrato, fissando il valore di significatività statistica a $P < 0,05$. Le analisi sono state eseguite utilizzando con il software SPSS ver. 23.0.

RISULTATI

Campioni fecali

La tipologia dei campioni raccolti e i sierotipi *Salmonella* identificati sono riportati nelle Tabelle 1 e 2.

Durante la prima visita in allevamento, sono stati raccolti 60 campioni individuali di feci da ciascuna delle due categorie di suini. *Salmonella* è stata isolata da 42 dei 60 campioni (70,0%) provenienti da animali in svezzamento e da 55 dei 60 campioni (91,7%) provenienti dagli animali in magronaggio. *Salmonella* è stata anche isolata dal 48,7% (19 su 39) dei campioni di suolo, dal 75% (9 su 12) dei campioni di acqua, dal 7,4% (2 su 27) dei campioni individuali di feci di uccelli selvatici, 50,0% (2 su 4) di campioni di feci di mammiferi selvatici (feci di volpi e conigli) e dal 50,0% (2 su 4) di campioni prelevati dalla superficie di attrezzature agricole.

Alla seconda visita in azienda, *Salmonella* è stata isolata dal 20,3% (16 su 79) dei campioni di suolo, dal 54,5% (12 su 22) dei campioni di acqua e dal 24,6% (17 su 69) dei campioni di feci di uccelli selvatici.

Durante la terza e ultima visita, *Salmonella* è stata isolata dal 16,7% (10 su 60) dei campioni di suolo, dal 56,8% (21 su 37) dei campioni di acqua in pool e dal 38,0% (27 su 71) dei campioni fecali di uccelli selvatici.

Complessivamente, è stata osservata una maggior prevalenza di *Salmonella* ($p < 0,05$) per i campioni raccolti dal campo 3 nel corso delle tre visite, rispetto a quella evidenziata in ciascuno degli altri due campi. Analoga differenza statisticamente significativa è stata osservata quando sono stati confrontati i dati aggregati dei campi 1 e 2 con quelli del campo 3.

Per quanto riguarda i soli campioni fecali di uccello, è stata rilevata una maggiore prevalenza di *Salmonella* ($p < 0,05$) nel campo 3, rispetto ai campioni raccolti dai campi 1 e 2.

Tabella 1. Isolamento di *Salmonella* da campioni ambientali e da feci di animali selvatici, raccolti durante le tre visite in allevamento da ciascun lotto di terreno.

Table 1. *Salmonella* isolated from individual environmental and wildlife samples from 3 fields at the 3 sampling visits.

Terreni campionati	Campioni raccolti	Visita in azienda	N. positivi/ N. campioni testati	CFU/ml	Sierotipo
Campo 1 (Vuoto da da due anni)	Feci di uccelli selvatici	Visita 1	1/19	1-10 (1)	Typhimurium (1)
		Visita 2	7/53	1-10 (3) 10-100 (1) 10 ³ -10 ⁴ (1) 10 ⁴ -10 ⁵ (1) 10 ⁵ -10 ⁶ (1)	Typhimurium (1) 4,5,12:i:- (1) Senftenberg (3)
				Visita 3	1/39
	Feci di coniglio	Visita 1	0/1		
		Visita 2	0/2		
	Feci di volpe	Visita 2	0/1		
	Feci di animali selvatici	Visita 3	0/7		
	Suolo	Visita 1	0/10		
		Visita 2	1/38	1-10 (1)	
		Visita 3	0/37		
	Acqua da pozzanghere	Visita 1	1/1	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
		Visita 2	2/5	1-10 (2)	4,5,12:i:- (2)
		Visita 3	1/16	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
	Campo 2 (Vuoto da tre anni)	Feci di uccelli selvatici	Visita 2	0/4	
Visita 3			2/7	1-10 (1) 10-100 (1)	Rissen (2)
Feci di coniglio		Visita 1	1/2	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
		Visita 2	0/3		
Feci di cane		Visita 2	0/2		
Feci di animali selvatici		Visita 3	0/1		
Suolo		Visita 2	0/6		
		Visita 3	1/8	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
Acqua da pozzanghere		Visita 1	1/1	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
		Visita 2	0/5		
		Visita 3	1/2	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)

Campo 3	Feci di uccelli selvatici	Visita 1	1/8	1-10 (1)	
		Visita 2	0/12		
		Visita 3	24/25	1-10 (3) 10-100 (6) 100-10 ³ (8) 10 ³ -10 ⁴ (5) 10 ⁵ -10 ⁶ (2)	4,5,12:i:- (1)
	Feci di volpe	Visita 1	1/1	1-10 (1)	4,5,12:i:- (1)
	Feci di animali selvatici	Visita 2	0/1		
		Visita 3	0/1		
	Suolo	Visita 1	19/29	1-10 (14) 10-100 (4)	4,5,12:i:- (11) Rissen (3) Panama (1)
		Visita 2	15/35	1-10 (4)	4,5,12:i:- (1) Rissen (2)
		Visita 3	9/15	1-10 (8) 10-100 (1)	4,5,12:i:- (8) Rissen(1)
	Acqua da pozzanghere	Visita 1	7/10	1-10 (7)	4,5,12:i:- (4) Rissen (1)
		Visita 2	10/12	1-10 (7) 10-100 (1)	4,5,12:i:- (1) Rissen (2)
		Visita 3	19/19	1-10 (9) 10-100 (7) 100-10 ³ (3)	4,5,12:i:- (1) Rissen (2) Derby (1)
	Attrezzature agricole	Visita 1	2/4	1-10 (2)	4,5,12:i:- (1)

Tabella 2. Prevalenza di *Salmonella* nei campioni di feci raccolti per le diverse fasi produttive.
Table 2. *Prevalence of Salmonella-positive pig individual faecal samples from pigs.*

Settore di raccolta dei campioni	Visita in azienda	N. positivi/ N. campioni testati	CFU/ml	Sierotipo
Svezamento	Visita 1	42/60	1-10 (7) 10-100 (2) 100-10 ³ (8) 10 ³ -10 ⁴ (3)	4,5,12:i:- (18) Rissen (1)
Magronaggio	Visita 1	55/60	1-10 (1) 10-100 (6) 100-10 ³ (8) 10 ³ -10 ⁴ (3) 10 ⁵ -10 ⁶ (2)	4,5,12:i:- (17) Rissen (2)

Tabella 3. Risultati dell’isolamento di *Salmonella* da tamponi ambientali e pool di feci raccolti durante le tre visite in allevamento.

Table 3. *Salmonella* isolated in swab samples collected from 3 fields at the 3 sampling visits

Campioni di superficie	Visita in azienda	N. positivi/ N. campioni testati	Sierotipo
Svezzamento	Visita 1	15/18	4,5,12:i:- (3) Panama (1)
Magronaggio	Visita 1	17/17	4,5,12:i:- (2) Rissen (3)
Attrezzature agricole	Visita 1	5/5	4,5,12:i:- (3)
	Visita 2	3/13	Rissen (3)
	Visita 3	5/12	
Feci di uccelli selvatici	Visita 2	5/7	4,5,12:i:- (2)
	Visita 3	8/8	Rissen (1)
Suolo	Visita 2	5/20	

Tamponi ambientali

Alla prima visita, i campioni sono stati prelevati soprattutto dal campo ancora occupato dai suini. *Salmonella* è stata isolata dall’83,3% (15 su 18) e dal 100% (17 su 17) dei tamponi raccolti rispettivamente dai recinti dei suini in svezzamento e dei magroni (Tabella 3). Un totale di 40 campioni è stato raccolto durante le successive visite in azienda. Le tensostrutture destinate a ricevere il nuovo gruppo di suini e recentemente collocate nel campo lasciato vuoto per due anni sono state oggetto di campionamento. *Salmonella* è stata isolata dal 25,0% (5 su 20) dei campioni prelevati durante la seconda visita, mentre la stessa tipologia di campioni raccolti a 20 giorni di distanza (terza e ultima visita), sono risultati tutti negativi per *Salmonella*. Infine, *Salmonella* è stata isolata dal 23,1% (3 su 13) e dal 41,76% (5 su 12) dei campioni prelevati da attrezzature agricole, rispettivamente raccolti durante la seconda e la terza visita. Pool di escrementi di uccelli selvatici sono stati raccolti utilizzando i tamponi, qualora la consistenza fosse troppo umida da poter essere campionati singolarmente e da questi, *Salmonella* è stata isolata nel 71,4% (5 su 7) e nel 100% (8 su 8) dei tamponi raccolti rispettivamente durante la seconda e la terza visita in allevamento.

Risultati della coltura semi-quantitativa

Alti livelli di *Salmonella* sono stati riscontrati nei campioni di feci dei suini (10⁴-10⁵ CFU/g), (Tabella 2). Nei campioni di suolo e acqua, i livelli di *Salmonella* sono risultati essere generalmente bassi (1-10 CFU/g) per la maggior parte dei campioni, ad eccezione dei campioni ambientali raccolti dal campo occupato dai suini, in cui sono state riscontrate CFU/g più elevate (fino a 10² -10³ CFU/g in 3 campioni di acqua). Livelli insolitamente alti di *Salmonella* sono stati invece trovati nelle feci di uccelli selvatici: 10⁵-10⁶ CFU/g, da campioni raccolti durante la seconda e terza visita (Tabella 1).

Sierotipi e fagotipi

La maggior parte degli isolati di *Salmonella* erano *S. enterica* sierotipo 4,5,12: i: - (mST) seguiti da *S. Rissen*, *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium*, *S. Panama* e *S. Derby*. Il sierotipo mST è risultato quello isolato con maggiore frequenza dai campioni prelevati da suini (40

su 47; 85,1%), dal 46,7% (7 su 15) delle feci di uccelli, dal 78,5% (51 su 65) dei campioni ambientali, dal 57,1% (4 di 7) di campioni prelevati da attrezzature agricole e da feci di animali selvatici.

Tra i 35 isolati di *S. Typhimurium* e mST, soltanto due fagotipi sono stati identificati, DT193 e DT41. Tutti i ceppi sono risultati essere DT193 ad eccezione di una delle due *S. Typhimurium* isolate dai campioni di uccelli, identificata come DT41.

DISCUSSIONE

Salmonella è un agente ubiquitario in grado di colonizzare asintomaticamente l’intestino degli uccelli selvatici e, di conseguenza, di essere eliminata nell’ambiente mediante le loro feci (Andres et al., 2013). Studi sulla prevalenza di *Salmonella* associata agli uccelli selvatici sono generalmente incentrati su ceppi adattati ad alcune specie di uccelli, tuttavia è stato osservato che gli uccelli che vivono nelle vicinanze di allevamenti di suini hanno una maggiore probabilità di eliminare *Salmonella* rispetto agli uccelli che vivono in generale nell’ambiente rurale (Andres et al., 2013).

Il presente studio è stato condotto in un allevamento di suini all’aperto con elevata prevalenza di *Salmonella*. Il 70,0% e il 91,7% di campioni prelevati rispettivamente dai suini in svezzamento e dai magroni è risultato positivo all’esame batteriologico per *Salmonella* ed una prevalenza significativamente più elevata è stata riscontrata nei campioni raccolti dal campo ancora occupato dai suini alla prima visita in allevamento.

La capacità di *Salmonella* di sopravvivere nell’ambiente per un considerevole periodo di tempo è ormai un fatto ben assodato (Funk & Gebreyes, 2004).

Alla prima visita in azienda oltre il 50% dei campioni ambientali era positivo per *Salmonella*. È interessante osservare che il 28% dei campioni ambientali, raccolti uno e due mesi dopo il depopolamento dell’azienda, risultava essere ancora positivo e che *Salmonella* è stata isolata anche da campioni di suolo e acqua raccolti nel campo rimasto vuoto per 3 anni. Questi risultati confermano la capacità di *Salmonella* di sopravvivere nell’ambiente e come, di conseguenza, l’ambiente possa diventare una potenziale fonte di infezione per le successive partite di suini, per la fauna selvatica e in generale per tutti animali che vivono in allevamento. Tuttavia, è anche possibile che gli uccelli selvatici abbiano avuto un contributo nel ri-contaminare il terreno, considerando che *Salmonella* è stata isolata dagli escrementi di uccelli nel 7,4% (2 su 27) dei campioni raccolti durante la prima visita, nel 24,6% (17 su 69) dei campioni raccolti durante la seconda visita e nel 44,3% (35 su 79) dei campioni raccolti durante la terza visita. È evidente che, dopo che i maiali sono stati inviati al macello, è aumentata la proporzione di feci di uccelli positivi per *Salmonella*. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che il numero di uccelli selvatici che popolava i campi è aumentato considerevolmente, attratti probabilmente dal mangime dei suini non adeguatamente rimosso e probabilmente da popolazioni di vermi più vicine alla superficie del suolo (Andres et al., 2013; Andres & Davies , 2015).

Gli allevamenti all’aperto possono fungere da aree in cui gli uccelli selvatici si radunano, offrendo loro cibo e riparo (Andres et al., 2013). La prevalenza di *Salmonella* è risultata significativamente più elevata negli escrementi di uccelli raccolti dal campo occupato dai suini alla prima visita (campo 3). Gli uccelli selvatici che entrano in contatto con l’ambiente dell’allevamento possono rappresentare un pericolo zoonotico, in quanto possono infettarsi e albergare ceppi di *Salmonella* di maggiore importanza per gli animali e anche la salute pubblica (Pennycott et al., 2006).

Nelle vicinanze dell’allevamento oggetto di questo studio, c’era anche un corso d’acqua, che attirava un gran numero di uccelli selvatici, in particolare uccelli acquatici, come oche e gabbiani.

Un altro risultato interessante riguarda gli alti livelli di *Salmonella* riscontrati nelle feci degli uccelli (10^5 - 10^6 CFU/g) di gran lunga superiori rispetto a quelli riscontrati nei campioni ambientali (suolo e acqua, rispettivamente fino a 10 - 10^2 e 10^2 - 10^3 CFU/g).

L'elevata concentrazione di *Salmonella* rilevata nelle feci di questi uccelli suggerisce che le oche possano rappresentare una importante fonte di infezione, in grado di mantenere il ciclo epidemiologico di *Salmonella*, specialmente in aree dove vi siano grandi stormi di uccelli, nonché una potenziale fonte di contaminazione per l'ambiente esterno.

I sierotipi di *Salmonella* identificati nei campioni delle feci di uccelli analizzate, mST, *S. Rissen*, *S. Senftenberg*, *S. Derby*, *S. Panama* e *S. Typhimurium*, sono gli stessi che si trovano comunemente nei suini nel Regno Unito (Hughes et al., 2008).

S. Typhimurium è il sierotipo più comunemente associato agli uccelli selvatici (Andres et al., 2013; Hughes et al., 2008). Al contrario, la maggior parte dei ceppi di *Salmonella* isolati in questo studio da feci di uccelli erano mST DT193. Soltanto un sierotipo di *S. Typhimurium* è stato identificato come DT 41, fagotipo comunemente associato agli uccelli acquatici, ed già precedentemente riscontrato nel Regno Unito (Hughes et al., 2008; Pennycott et al., 2006).

Il fatto che i suini siano riconosciuti come principale serbatoio del sierotipo mST DT193 (Crayford et al., 2014) supporta l'ipotesi che siano essi a costituire la principale fonte di infezione per uccelli selvatici.

È interessante notare che 25 dei 38 campioni positivi per mST provenivano da feci di oca, con un livello insolitamente elevato di *Salmonella* (10^5 - 10^6 CFU/g). Pertanto, è ragionevole ipotizzare che l'infezione da mST nelle oche selvatiche non causi sintomi clinici in questa specie di uccelli. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio il ruolo delle oche e il motivo per si riscontrino tali elevati livelli di mST.

I risultati ottenuti dimostrano la possibilità di una infezione bi-direzionale tra suini e uccelli selvatici e che le popolazioni di uccelli selvatici sono in grado di riciclare l'infezione e contribuire alla persistenza di *Salmonella* tra lotti diversi di suini.

I risultati ottenuti dimostrano inoltre come *Salmonella* possa persistere nel suolo e nell'acqua negli allevamenti di suini all'aperto per oltre 3 anni.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Department for Environment, Food and Rural Affairs e la SIPAS per avere supportato questo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Anderson, E., Ward, L. R., de Saxe, M. J., & De Sa, J. (1977). Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *Epidemiology & Infection*, 78(2), 297-300.
2. Andres, S., Vico, J. P., Garrido, V., Grillo, M. J., Samper, S., Gavin, P., Herrera-León S, Mainar-Jaime, R. C. (2013). Epidemiology of subclinical salmonellosis in wild birds from an area of high prevalence of pig salmonellosis: phenotypic and genetic profiles of *Salmonella* isolates. *Zoonoses Public Health*, 60(5), 355-365. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01542.x
3. Andres, V. M., & Davies, R. H. (2015). Biosecurity Measures to Control *Salmonella* and Other Infectious Agents in Pig Farms: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 317-335. doi:10.1111/1541-4337.12137
4. APHA (Ed.) (2017). *Salmonella in livestock production in Great Britain, 2016* <https://www.gov.uk/government/publications/salmonella-in-livestock-production-in-great-britain-2016>.

5. Crayford, G., Coombes, J. L., Humphrey, T. J., & 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(11), 2507-2516.
6. EFSA. (2016). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. 14(12), 231. doi:doi: 10.2903/j.efsa.2016.4634
7. Funk, J., & Gebreyes, W. A. (2004). Risk factors associated with *Salmonella* prevalence on swine farms. *Journal of Swine Health and Production*, 12(5), 246-251.
8. Grimont, P. A., & Weill, F.-X. (2007). Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO collaborating centre for reference and research on Salmonella*, 9, 1-161.
9. Houston, S. (2013). Structure of the UK pig industry. *The Pig Journal*, 69, 1-6.
10. Hughes, L. A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A. H., Williams, N. J., Bennett M, de Pinna E, Lawson B, Cunningham AA, Chantrey, J. (2008). Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 - 2006. *BMC Vet Res*, 4, 4. doi:10.1186/1746-6148-4-4
11. Pennycott, T. W., Park, A., & Mather, H. A. (2006). Isolation of different serovars of *Salmonella enterica* from wild birds in Great Britain between 1995 and 2003. *Veterinary Record*, 158(24), 817-820. doi:10.1136/vr.158.24.817
12. Wales, A., Breslin, M., & Davies, R. (2006). Semiquantitative assessment of the distribution of *Salmonella* in the environment of caged layer flocks. *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 309-318.
13. Zheng, D. M., Bonde, M., & Sørensen, J. T. (2007). Associations between the proportion of *Salmonella* seropositive slaughter pigs and the presence of herd level risk factors for introduction and transmission of *Salmonella* in 34 Danish organic, outdoor (non-organic) and indoor finishing-pig farms. *Livestock Science*, 106(2), 189-199. doi:<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.08.003>

STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS IN SUINETTI SOTTOSCRIFA IN DUE ALLEVAMENTI A CICLO CHIUSO

STUDY ON THE TRASMISSION OF MYCOPLASMA HYORHINIS IN SUCKLING PIGLETS IN TWO FARROW-TO-FINISH FARMS

USTULIN M.¹, CATANIA S.², GOBBO F.³, TARGHETTA C.¹, PIERASCO A.¹, TOSON M.⁴, VIO D.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione territoriale di Verona, Verona

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Medicina Aviare, Legnaro (PD)

⁴ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Epidemiologia Veterinaria, Legnaro (PD)

Parole chiave: *Mycoplasma hyorhinis*, suinetti

Keywords: *Mycoplasma hyorhinis*, piglets

Riassunto: Considerato in passato dalla maggior parte dei ricercatori come semplice commensale, negli ultimi anni si sta rivalutando il ruolo patogeno di *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*). Questo batterio è stato isolato in corso di patologie quali polisierositi e artriti e si ritiene possa avere un ruolo anche nello sviluppo di patologia respiratoria nell'ambito del Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC). Nel corso del presente studio è stata valutata la presenza e la diffusione di *M. hyorhinis* a livello delle cavità nasali di scrofe e suinetti nel corso del primo mese di vita dei suinetti in due allevamenti a ciclo chiuso.

È stata osservata una diffusione precoce del batterio, con positività di circa il 90% tra suinetti di 30 giorni di vita, anche a fronte di una limitata e discontinua positività nelle scrofe.

Abstract: For a long time regarded as a possible commensal, the pathogenic role of *Mycoplasma hyorhinis* is now under re-evaluation. This bacterium has been isolated in cases of arthritis and polyserositis and seems to play an important role in PRDC (Porcine Respiratory Disease Complex).

During the present study, presence and diffusion of *M. hyorhinis* in nasal cavity of sows and piglets during the first month of life were evaluated in two farrow-to finish farms.

An early diffusion of the bacteria was observed, with nearly 90% of piglets positive by 30 days of age, although only a few sows resulted discontinuously positive.

INTRODUZIONE

Descritto per la prima volta nel 1955, *M. hyorhinis* viene frequentemente isolato dal tratto respiratorio superiore dei suini, in particolare dalle cavità nasali, dove aderisce alle cellule ciliate dell'epitelio. Seppur comunemente considerato un germe commensale delle prime vie aeree, *M. hyorhinis* è in grado di diffondere, attraverso meccanismi non ancora compiutamente descritti, in vari organi e causare polisierositi e artriti nei suini in svezzamento e magronaggio e artriti nei suini all'ingrasso.

I risultati degli studi eseguiti fino ad oggi hanno messo in evidenza che *M. hyorhinis* viene trasmesso dalla scrofa ai suinetti lattanti durante le prime settimane di vita, e tra suinetti nelle fasi di allevamento successive (Kobisch and Friis 1996). Ad oggi non sono stati condotti studi specifici in merito all'epidemiologia di questo batterio e la maggior parte delle ricerche sono state condotte negli anni '70-'80, agli albori dei sistemi di allevamento industriale e in

situazioni di pressione infettiva nettamente diversa da ora e, per la maggior parte, in suini da ingrasso.

Il ruolo patogeno di *M. hyorhinis* è stato messo in discussione negli ultimi anni; attualmente, in ragione dell'aumento degli isolamenti di questo germe in casi di polisierosite e di malattia respiratoria in soggetti giovani, il suo ruolo viene rivalutato anche grazie a un innegabile miglioramento delle metodiche diagnostiche.

Le conoscenze relative alla diffusione di questo patogeno nel nostro Paese sono scarse, così come le informazioni relative alla frequenza delle patologie causate da *M. hyorhinis*, sia in termini di dati clinici che di laboratorio. Scopo del presente studio è stato quello di verificare la diffusione di *M. hyorhinis* in due aziende a ciclo chiuso e di valutare la trasmissione dalla scrofa ai suinetti durante il primo mese di vita.

MATERIALI E METODI

Per il presente studio, svolto tra marzo e agosto 2017, sono state selezionate due aziende a ciclo chiuso site in Friuli Venezia Giulia; in tabella 1 vengono riassunte le caratteristiche principali delle due aziende candidate allo studio.

Tabella 1: caratteristiche delle aziende/Breeding farm characteristics

	Azienda 1	Azienda 2
Dimensione (numero di scrofe)	220	250
Genetica	Danese, rimonta esterna	Danese, rimonta esterna
PRRS	Positiva, instabile	Positiva, stabile
Vaccinazioni		
Scrofe	PRRS ogni 3 mesi Parvovirus e Mal Rosso allo svezzamento Rinite atrofica a fine gravidanza	PRRS ogni 4 mesi PCV2 ogni 4 mesi Influenza ogni 4 mesi Rinite a 90giorni di gravidanza Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto
Suinetti	PCV2, <i>M. hyopneumoniae</i> 21 giorni	Colibacillosi 18 giorni PCV2 30 giorni <i>M. hyopneumoniae</i> 80 giorni
Trattamenti		
Scrofe	Ivermectina prima dell'entrata in sala parto	Levamisole
Suinetti	Alla castrazione: cefalosporina Anticoccidico Ferro Allo svezzamento: amoxicillina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico Anticoccidico Ferro Allo svezzamento: amoxicillina
Età di svezzamento	25	26-28
Bande	trisettimanali	trisettimanali

Il piano di campionamento ha previsto il prelievo di tamponi nasali a carico delle scrofe e dei relativi suinetti.-

Da ciascun allevamento sono state identificate tre scrofe al mese per tre mesi successivi. Sono state scelte scrofe di vario ordine di parto in modo da avere un campione rappresentativo di tutte le età; per ciascuna scrofa è stato eseguito il prelievo di un tampone nasale due giorni prima della data prevista del parto.

Dopo il parto, dalla nidiata di ogni scrofa selezionata, sono stati identificati mediante

apposizione di marca auricolare tre suinetti che a 2, 8, 18 giorni di età sono stati sottoposti a prelievo di un tampone nasale; contestualmente al prelievo del tampone nasale dai suinetti si è proceduto alla stessa operazione a carico della madre. Le nidiata selezionate non sono state sottoposte ad operazione di baliaggio e pareggiamento delle nidiata.

Al trentesimo giorno di età si è proceduto ad un ulteriore prelievo di tampone nasale a carico dei suinetti, precedentemente identificati. È stato richiesto agli allevatori di conservare i soggetti morti nel corso dello studio al fine di sottoporli ad esame necroscopico volto a determinare le cause della morte. In funzione delle lesioni riscontrate nei soggetti deceduti, sono stati eseguiti esami batteriologici e virologici per identificare gli agenti infettivi più comuni nel suino nelle fasce di età oggetto di studio.

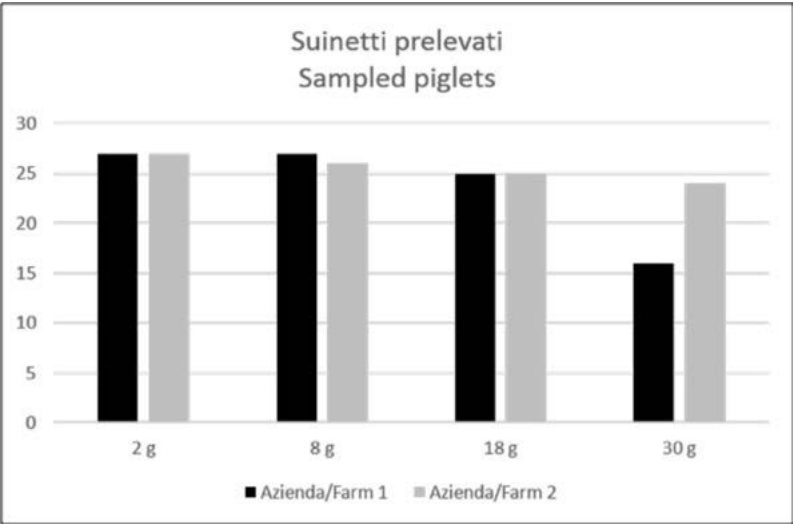
Il campionamento è stato progettato ipotizzando una prevalenza intra-aziendale del 70%, $\alpha=10\%$ e accuratezza=15%; si evidenzia che il numero di suinetti sottoposti al prelievo di tampone nasale è superiore al numero minimo richiesto per la valutazione della prevalenza intra-aziendale in un'azienda di medie dimensioni.

I tamponi nasali sono stati sottoposti alla ricerca di *M. hyorhinis* e *Mycoplasma hyopneumoniae* tramite multiplex real time PCR per l'evidenziazione di un tratto specie-specifico del gene 16S di *M. hyorhinis* (Cavijo et al., 2014) e del gene p102 di *M. hyopneumoniae* (Marois et al., 2009). La metodica, sviluppata presso la Sezione di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, prevede l'utilizzo di primer e sonda per DNA eucariotico come controllo interno (Lopez-Andreo et al., 2005).

RISULTATI

In totale sono stati prelevati 72 tamponi nasali da 18 scrofe, 54 da suinetti a 2 giorni di vita, 53 a 8 giorni, 49 a 18 giorni e 41 a 30 giorni di vita; nella Tabella 2 viene mostrata la suddivisione dei prelievi tra le due aziende selezionati.

Tabella 2: numero di suinetti campionati per azienda sul periodo considerato/number of sampled piglets for each farm



11 dei 72 tamponi prelevati da nove differenti scrofe sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, soltanto due scrofe sono risultate positive a più di un campionamento.

Per quanto concerne i suinetti, solo uno dei 54 tamponi prelevati a 2 giorni di età è risultato positivo per *M. hyorhinis* (1.85%; 95% di intervallo di confidenza (95% CI): 0.05-9.89%), 11 tamponi su 53 sono risultati positivi per *M. hyorhinis* a 8 giorni di età (20.75%; 95%CI: 10.84-34.11%), 35 su 51 a 18 giorni (68.63%; 95%CI: 54.11-80.89%) e 37 su 41 a 30 giorni (37/41=90.24%; 95%CI: 76.87-97.28%). Nessuno dei campioni prelevati è risultato positivo per *M. hyopneumoniae*. Nell'azienda 1 dei 27 soggetti sottoposti a campionamento a 2 giorni di età solo un soggetto è risultato positivo (3,7%); a 8, 18 e 30 giorni sono risultati positivi rispettivamente 6/27 (22,2%), 16/25 (64%) e 12/16 (75%) soggetti; nell'azienda 2 non sono state rilevate positività nei soggetti prelevati a 2 giorni di età, mentre il numero di animali positivi rilevato è stato pari a 4/26 (15,4%) a 8 giorni, 19/24 (79,2%) a 18 giorni e 24/24 (100%) a 30 giorni di età. I risultati sono riassunti in tabella 3.

Tabella 3: Risultati/results

Età suinetti (giorni)	Azienda 1		Azienda 2	
	Scrofe positive	Suinetti positivi	Scrofe positive	Suinetti positivi
-2	2/9		3/9	
2	0/9	1/27	0/9	0/27
8	0/9	5/27	1/9	4/26
18	2/9	16/25	3/9	19/24
30		12/17		24/24

Nelle tabelle 4 e 5 viene mostrata la distribuzione dei campioni prelevati dai suinetti risultati positivi per *M. hyorhinis* in funzione dell'età dei suinetti al momento del prelievo.

Tabella 4: distribuzione dei campioni positivi nei suinetti nell'azienda 1/distribution of positive piglets in farm 1

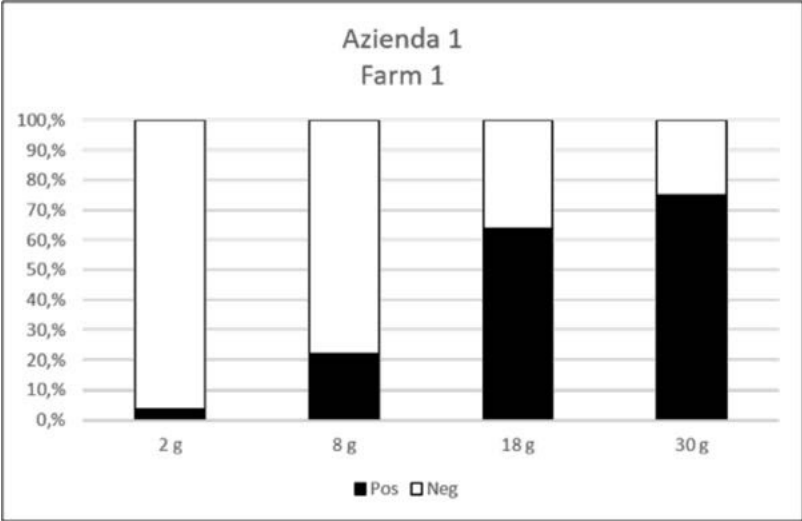
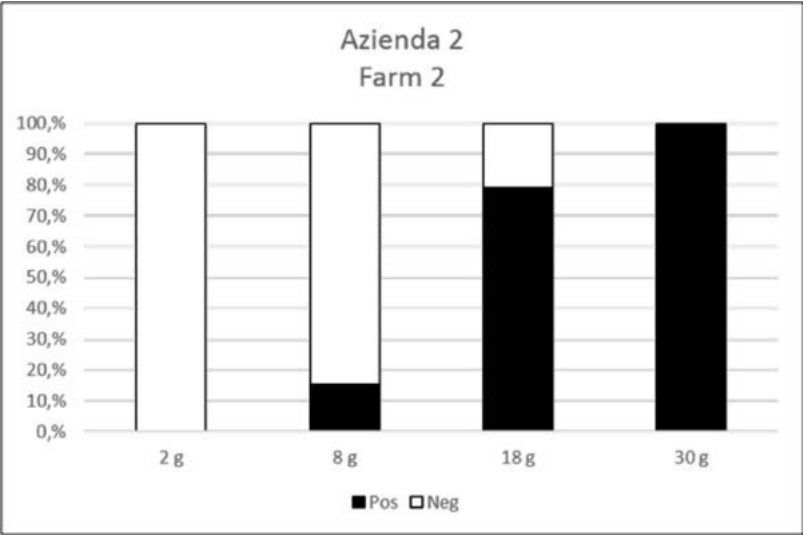


Tabella 5: distribuzione dei campioni positivi nei suinetti nell'azienda 2/ distribution of positive piglets in farm 2



Nel corso dello studio è stata registrata la mortalità di 11 soggetti, tra quelli in esame, nell'azienda 1 e di 4 soggetti dell'azienda 2. Gli esami necroscopici e le successive analisi condotti a carico dei quattro soggetti deceduti nel periodo considerato nell'azienda 2 hanno permesso di ricondurre la causa della morte ad eventi traumatici in 3 soggetti e a meningite da *Streptococcus suis* in un soggetto di 33 giorni, deceduto dopo l'ultimo campionamento; da nessuno di questi soggetti è stata identificata la presenza di *M. hyorhinis* a livello polmonare. Nell'azienda 1 si è verificata una mortalità importante in uno dei gruppi in analisi. Per problematiche gestionali l'allevatore non ha potuto conservare le carcasse e pertanto non sono stati eseguiti gli esami necroscopici previsti dal protocollo dello studio; le analisi effettuate sui coetanei hanno evidenziato la circolazione del virus della PRRS nel periodo compreso tra i campionamenti a 18 e 30 giorni di età; sia a livello polmonare che meningeo è stato isolato *Streptococcus suis*, mentre non è stata identificata la presenza di *M. hyorhinis* a livello polmonare.

DISCUSSIONE

M. hyorhinis viene frequentemente isolato dal tratto respiratorio superiore dei suini e, anche se comunemente considerato un germe commensale delle prime vie aeree, è in grado di diffondere, attraverso meccanismi non ancora pienamente descritti, a vari organi e causare polisierositi e artriti nei suini in svezzamento e magronaggio e artriti nei suini all'ingrasso. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la trasmissione di *M. hyorhinis* nei suinetti sottoscrofa in due allevamenti a ciclo chiuso siti in Friuli Venezia Giulia. La distribuzione delle positività nei suinetti suggerisce una instaurazione precoce dell'infezione a livello delle cavità nasali e una rapida diffusione del batterio nella fase sottoscrofa. In entrambi gli allevamenti selezionati si assiste ad un netto aumento dei soggetti positivi tra il primo prelievo a due giorni di vita e il secondo prelievo eseguito a otto giorni di età; nell'allevamento 1 a due giorni un solo soggetto è risultato positivo per *M. hyorhinis* mentre a otto giorni sono risultati positivi 6/21 soggetti; lo stesso andamento è stato rilevato

nell'allevamento 2 in cui è stata registrata positività in 4/26 soggetti a otto giorni di vita, a fronte di completa negatività a due giorni. I risultati delle analisi condotte sui tamponi nasali prelevati a 18 e 30 giorni hanno rilevato positività rispettivamente in 16/25 e 12/16 soggetti dell'allevamento 1 e 19/24 e 24/24 soggetti dell'allevamento 2, evidenziando una percentuale di soggetti infetti a livello nasale pari al 75% per l'allevamento 1 e pari al 100% per l'allevamento 2. I risultati ottenuti sono parzialmente discordanti con quanto rilevato in precedenti studi; in analogia con lo studio condotto da Clavijo *et al* (2017) il nostro studio ha messo in evidenza che il numero di scrofe eliminatrici per via nasale è numericamente limitato e che il numero di suinetti neonati che albergano *M. hyorhinis* a livello nasale nei primi due giorni di vita è molto basso. Il riscontro di un numero limitato di scrofe eliminatrici è indice di eliminazione intermittente del batterio dalle cavità nasali anche se non è possibile escludere altre vie di eliminazione, non indagate in questa ricerca, quali i secreti vaginali e il latte, in analogia con quanto già evidenziato per altre specie di Micoplasmi per esempio *Mycoplasma bovis* in mandrie di bovini. Il nostro studio ha evidenziato una rapida diffusione nella fase sottoscrofa ad iniziare da 8 giorni di età, mentre nello studio di Clavijo *et al* la diffusione di *M. hyorhinis* non è stata significativa prima dei 28 giorni di vita. Tale differenza è presumibilmente riconducibile alla differente gestione aziendale in termine di strutture e rimescolamento delle nidiatae tra i sistemi di allevamento italiani e americani. Gli esami necroscopici condotti sulle carcasse dei soggetti venuti a morte durante il periodo di studio non hanno evidenziato lesioni ascrivibili all'infezione da *M. hyorhinis* e le metodiche biomolecolari applicate non ne hanno messo in evidenza la presenza; *Streptococcus suis* e il virus della PRRS identificati sono caratteristici agenti patogeni del suino nelle fasi di età oggetto di studio. L'assenza di *M. hyorhinis* a livello polmonare e articolare è molto probabilmente ascrivibile all'effetto protettivo dovuto alla presenza di anticorpi colostrali, in analogia a quanto descritto in precedenza da altri autori (Fano *et al.*, 2007; Rovira *et al.*, 2006), che impediscono a *M. hyorhinis* di aggredire la parte più profonda dell'albero respiratorio ma non svolgono alcun effetto sulla colonizzazione delle vie nasali e, indirettamente, permettono la diffusione del germe negli ambienti di allevamento e la colonizzazione di altri soggetti.

CONCLUSIONI

I dati finora raccolti hanno permesso di identificare una diffusione precoce di *M. hyorhinis* nelle prime vie respiratorie dei suinetti. Lo studio sta proseguendo per verificare la diffusione e la permanenza del batterio a livello polmonare oltre che l'associazione con altre eventuali infezioni concomitanti e la gravità delle lesioni anatomo-patologiche e verificare la presenza di *M. hyorhinis* nei secreti vaginali delle scrofe e nel latte. Sono inoltre in corso campionamenti in allevamenti a ciclo aperto i cui risultati permetteranno il confronto tra i due sistemi produttivi (ciclo aperto e ciclo chiuso).

Il presente studio rappresenta una delle prime valutazioni sulla presenza di *M. hyorhinis* in allevamenti italiani, nonché una base per una valutazione del suo ruolo nella PRDC.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/15 "Ruolo di *Mycoplasma hyorhinis* nel Complesso delle Malattie Respiratorie del suino in due diversi sistemi di produzione suinicola del Nord-Est Italia" finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

Clavijo M.J., Oliveira S., Zimmerman J., Rendahl A., Rovira A. (2014). Field evaluation of a quantitative polymerase chain reaction assay for *Mycoplasma hyorhinis*. J Vet Diagn Invest. 2014 Nov;26(6):755-60. doi: 10.1177/1040638714555175. Epub 2014 Oct 15.

Clavijo M. J., Murray D., Oliveira S., Rovira A. (2017). Infection dynamics of *Mycoplasma*

hyorhinis in three commercial pig populations. Vet Rec. 2017 Jul 15;181(3):68. doi: 10.1136/vr.104064. Epub 2017 Apr 19.

Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J. (2007). Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs, Canadian Journal of Veterinary Research, 71, 195–200.

Gomes-Neto J.C., Bower L., Erickson B.Z., Wang C., Raymond M., Strait E.L. (2015). Quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in pen-based oral, tonsillar, and nasal fluids. Vet Sci. 2015;16(2):195-201. Epub 2015 Jan 30. <https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.2.195>

Kobish, M. e Friis N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. Revue scientifique et technique 15, 1569–605.

López-Andreo M., Lugo L., Garrido-Pertierra A., Prieto M.I., Puyet A. (2005). Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. Anal Biochem. 2005 Apr 1;339(1):73-82.

Marois C., Dory D., Fablet C., Madec F., Kobisch M. (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. J Appl Microbiol. 2010 May;108(5):1523-33. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04556.x. Epub 2009 Oct 7.

Rovira A, Clavijo MJ, Oliveira S. (2010). *Mycoplasma hyorhinis* infection of pigs. Acta Sci Vet 38(Suppl 1):s9–s15.

Thacker E.L. (2006). Mycoplasmal Disease. In Straw EB *et al.* Diseases of swine. 9th edition. Ames, IA.: Blackwell Publishing Ltd.; 2006. p. 90, 707–709.

**RISULTATI DI UN SURVEY SULLA GESTIONE DELLE
SCROFETTE E SULL'ACCLIMATAMENTO VERSO
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN ITALIA**

**SURVEY IN THE ITALIAN SWINE INDUSTRY ON GILTS
MANAGEMENT AND ACCLIMATION PROCESS FOR
*MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE***

ANDREONI S., LEOTTI G., BIANCHI M., DIAS A.S., TOMMASINI N.

Boehringer Ingelheim Italia AH - Milano

Parole chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, acclimatemento scrofette, catena di prevenzione e infezione

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, Gilt acclimation, Infection/Prevention chain

Riassunto: Le scrofette da rimonta dovrebbero essere considerate nella gestione della catena d'infezione e prevenzione di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp). Mhp ha un basso tasso di riproduzione ($R_n = 1,16$) ma presenta un'infezione persistente nel tempo (fino a 214 giorni post-infezione), rendendo quindi le scrofette infette, fonte di trasmissione del patogeno ai suinetti in sala parto. Un corretto programma di acclimatemento dovrebbe consentire di ridurre la trasmissione di Mhp dalle scrofette ai suinetti, ridurre la prevalenza pre-svezzamento e i problemi respiratori in ingrasso. L'obiettivo di questo survey, è stato quello di indagare i protocolli di gestione e acclimatemento delle scrofette, in particolare verso Mhp, presenti in Italia.

È stato sviluppato un survey (19 domande), completato in 149 scrofaie da 122 veterinari. L'analisi dei dati mostra alcuni punti critici che dovrebbero essere presi in considerazione nella gestione di Mhp. La maggior parte delle aziende, con rimonta esterna o mista, introduce scrofette Mhp positive o con status sconosciuto (77,8%; 70/90), ma solo alcuni verificano lo status all'arrivo (10%; 9/90). L'acclimatemento verso Mhp è eseguito solo in alcune aziende (24,2%; 36/149) senza indagare l'efficacia del processo. La vaccinazione contro Mhp è la procedura di acclimatemento più utilizzata (36,2%; 54/149). Poche aziende valutano la prevalenza di Mhp nei suinetti pre-svezzamento (10,1%; 15/149). La maggior parte delle aziende (45,6%; 68/149) ha un alto tasso di rimonta (>41%) con un numero elevato di arrivi l'anno.

Abstract: The replacement gilts have to be considered in the *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhp) infection/prevention chain. Mhp with a low reproduction ratio ($R_n = 1.16$) but persistent infection (up to 214 days post infection, dpi) lead to the assumption that the gilts at first farrowing might be a key point for Mhp transmission to the piglets. A correct gilt acclimation program should reduce the Mhp shedding at first farrowing, the Mhp pre-weaning prevalence and respiratory problems in fatteners. The objective of this survey was to learn more about the origin of replacement gilts and the Mhp gilt acclimation protocol in the Italian swine industry.

A survey composed of 19 questions was developed. In total, the survey was completed for 149 sow farms by 122 veterinarians. This survey shows some critical factors that have to be considered in the Italian swine industry when applying the Mhp infection/prevention chain control; Most of the farms introduced Mhp-positive or unknown replacement gilts (77,8%; 70/90), but only a few verify the status on arrival (10%; 9/90). Mhp gilt acclimation

is performed in a few farms (24,2%; 36/149) without investigating the efficacy of the process. Mhp vaccination is the most used gilt acclimation procedure (36,2%; 54/149). Only a few farms determine the Mhp prevalence in piglets at weaning (10,1%; 15/149). Most farms (45,6%; 68/149) have a high replacement rate (>41%) with high numbers of arrivals/year.

INTRODUZIONE

Mycoplasma hyopneumoniae (Mhp) è l’agente eziologico della polmonite enzootica suina (EP), malattia respiratoria che colpisce principalmente il suino nelle fase di magronaggio-ingrasso. Nonostante l’utilizzo di vaccini e trattamenti antimicrobici mirati, le perdite economiche causate da questo patogeno sono ancora una preoccupazione per l’industria suinicola. La trasmissione di Mhp avviene principalmente per contatto diretto (naso-naso) tra i suini durante l’accrescimento, da suini infetti a suini recettivi oppure, sempre per contatto diretto, dalle scrofe ai suinetti [1]. Considerando che la trasmissione intrauterina di Mhp non è possibile e che gli anticorpi di origine materna non sono completamente protettivi contro l’infezione, i suinetti appena nati sono sensibili alla colonizzazione di Mhp solo da parte delle madri [2]. Il contatto tra le scrofe infette e suinetti sottoscrofa può essere il punto di partenza della catena d’infezione di Mhp, e probabilmente un fattore di rischio per lo sviluppo della sintomatologia respiratoria durante la fase di accrescimento [3,4]. La percentuale di scrofe che eliminano Mhp attraverso le secrezioni nasali diminuisce con l’aumentare dell’età: si pensa quindi che le scrofe di primo parto siano la fonte principale di trasmissione del patogeno ai suinetti [5]. Pur avendo un basso tasso di riproduzione ($R_n = 1,16$) [6], Mhp manifesta un’infezione persistente nel tempo (fino a 214 giorni dopo l’infezione) [7], facendo sì che scrofette potenzialmente infette possano eliminare Mhp al primo parto [8]. In effetti, l’assenza di un processo di acclimatamento specifico delle scrofette verso Mhp è stato classificato come un importante fattore di rischio per la gestione della malattia [2]. Pertanto, un adeguato acclimatamento delle scrofette verso Mhp, incentrato sulla riduzione della diffusione di Mhp da parte della scrofetta al momento del parto, dovrebbe potenzialmente diminuire la prevalenza di Mhp nei suinetti allo svezzamento e di conseguenza aiutare a gestire meglio le problematiche respiratorie successive [4,8]. A oggi, informazioni su programmi di acclimatamento specifici per Mhp sono limitate, però se si parla di scrofette Mhp-negative, il processo di acclimatamento/esposizione delle scrofette descritto in letteratura dovrebbe avere inizio entro e non oltre i 50 giorni di età, al fine di far superare il processo infettivo e di guarire in modo sicuro e controllato, prima che diventino una fonte di infezione per la loro progenie al primo parto (circa 350 giorni di vita) [8]. In letteratura sono presenti lavori che hanno cercato di valutare quali processi di acclimatamento delle scrofette verso Mhp vengono utilizzati negli Stati Uniti, in Messico, in Spagna ed in Europa [9-12]. Il presente lavoro è stato quindi progettato per cercare di conoscere meglio la catena d’infezione [13] di Mhp nella situazione Italiana, per meglio conoscere i processi di gestione della rimonta e lo status sanitario delle scrofette nei confronti di Mhp e per poter meglio studiare protocolli da applicare nell’attuazione della catena di prevenzione verso Mhp in allevamento.

MATERIALI E METODI

Per valutare il ruolo delle scrofette nell’epidemiologica di Mhp in Italia, è stato preparato un survey, come già fatto in altri paesi [10-13]. Il questionario, dal titolo “Gestione delle scrofette nei confronti di Mhp” (Figura 1), destinato ai Medici Veterinari è composto da 19 domande e diviso funzionalmente in due parti; la prima con domande riguardanti i dati demografici delle scrofaie e la gestione delle rimonta, la seconda invece più specifica sulle

procedure di acclimatamento delle scrofette verso Mhp e sulla gestione della malattia nel sistema produttivo italiano. Ogni survey riporta i dati di una scrofaia. I dati sono stati raccolti nei mesi di Settembre e Ottobre 2017.

Figura 1: Survey “Gestione delle scrofette nei confronti di Mhp”
Figure 1: Survey “Mhp gilt management”

The image shows a screenshot of a survey form titled "GESTIONE DELLE SCROFETTE NEI CONFRONTI DI MHP". The form is designed for veterinarians to fill out and is divided into two main sections: "1. DATI GENERALI" and "2. GESTIONE DELLE SCROFETTE".

Section 1: DATI GENERALI

- 1. NOME E COGNOME DEL VETERINARIO: _____
- 2. TIPO DI ALLEVAMENTO:
 - ☐ Ciclo chiuso
 - ☐ Altro: _____
 - ☐ Ciclo aperto
- 3. NUMERO DI SCROFE:
 - ☐ <200
 - ☐ 201-500
 - ☐ 501-1000
 - ☐ 1001-2000
 - ☐ >2000
- 4. % RIMONTA:
 - ☐ <10%
 - ☐ 10-30%
 - ☐ 30-40%
 - ☐ 40-50%
 - ☐ 50-60%
 - ☐ >60%
- 5. TIPO DI RIMONTA:
 - ☐ Interna
 - ☐ Esterna
 - ☐ Mista
- 6. QUAL È LO STATUS M. HYO DELLA SCROFAIA DI PROVENIENZA?
 - ☐ M. hyo Negativo
 - ☐ Non conosciuto
 - ☐ M. hyo Positivo

Section 2: GESTIONE DELLE SCROFETTE

- 7. ETÀ DI ENTRATA IN SCROFAIA DELLE SCROFETTE (GG): _____
- 8. ETÀ DELLA PRIMA COPERTURA (GG): _____
- 9. LE SCROFETTE CHE ACCEDONO DA RIMONTA INTERNA SONO GIÀ STATE VACCINATE PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 10. CONTROLLI LO STATUS M. HYO ALL'ARRIVO TRAMITE INDAGINE DIAGNOSTICA?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 11. PRESENZA DI M. HYO NELLE SCROFETTE DURANTE L'ACCRESIMENTO (DIAGNOSTICA, SEGNI CLINICI)?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 12. UTILIZZI UN LOCALE QUARANTENA PER L'ACCLIMATAMENTO IN GENERALE DELLE SCROFETTE?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 13. PRATICHI UN ACCLIMATAMENTO SPECIFICO PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 14. UTILIZZI ANTIBIOTICI CONTRO M. HYO DURANTE L'ACCLIMATAMENTO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 15. VERIFICHI L'EFFICACIA DELL'ACCLIMATAMENTO PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 16. VACCINI LE SCROFETTE PRIMA DELLA FECONDAZIONE PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 17. VACCINI LE SCROFE PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 18. VACCINI I LATTONI PER M. HYO?
 - ☐ Sì
 - ☐ No
- 19. TESTI LA PRESENZA DI M. HYO NEI SUINETTI SOTTOSCROFAT?
 - ☐ Sì
 - ☐ No

The form ends with a "GRAZIE PER AVER PARTECIPATO!" message.

RISULTATI

Sono di seguito riportati i risultati dell’elaborazione delle risposte alle diverse domande del questionario. Sono stati intervistati un totale di 122 Veterinari e sono stati compilati 149 questionari in 10 diverse regioni italiane (Tabella 1).

Tipologia e dimensioni delle scrofaie

La tipologia di scrofaie coinvolte nella ricerca è risultata così suddivisa: 45,6% (68/149) scrofaie a ciclo aperto, 43% (64/149) scrofaie a ciclo chiuso e 11,4% (17/149) altro sistema produttivo (multisito, ciclo semiaperto o semichiuso). In base alle dimensioni, la percentuale di scrofaie censite è così suddivisa: 11,4% (17/149) scrofaie con meno di 200 scrofe; 30,9% (46/149) tra 201 e 500 scrofe; 28,9% (43/149) tra 501 e 1000 scrofe; 18,8% (28/149) tra 1001 e 2000 scrofe e 10,1% (15/149) con più di 2000 scrofe. Si è stimato di aver raccolto informazioni su circa 130.000 scrofe. Le dimensioni dell’allevamento più rappresentata nei cicli aperti è quella compresa tra 500 e 1000 scrofe (30,9%) mentre nei cicli chiusi quella tra le 200 e le 500 scrofe (40,6%) (Tabella 2).

Tabella 1: Suddivisione dei questionari per regione.
Table 1: Numbers of survey per Italian regions.

Regione	N° Questionari	%
Lombardia	54	36,2%
Veneto	35	23,5%
Emilia Romagna	16	10,7%
Umbria	11	7,4%
Piemonte	10	6,7%
Friuli Venezia Giulia	9	6,0%
Marche	6	4,0%
Toscana	5	3,4%
Basilicata	2	1,3%
Abruzzo	1	0,7%
TOTALE	149	100%

Tabella 2: Correlazione tra dimensioni e tipologia di allevamento.
Table 2: Correlation between farm size and production system.

Dimensioni	Ciclo Chiuso		Ciclo Aperto		Altro	
	N°	%	N°	%	N°	%
<200	11	17,2%	6	8,8%	0	0%
201-500	26	40,6%	13	19,1%	7	41,2%
501-1000	19	29,7%	21	30,9%	3	17,6%
1001-2000	7	10,9%	14	20,6%	7	41,2%
>2000	1	1,6%	14	20,6%	0	0%
Totale	64	100,0%	68	100,0%	17	100,0%

Gestione della rimonta

In base alle percentuali di rimonta riportate, le scrofaie sono così suddivise: percentuale di rimonta minore del 30% nel 6% delle scrofaie (9/149); tra il 30% e il 35% nel 23,5% delle scrofaie (35/149); tra il 36% e il 40% nel 24,8% delle scrofaie (37/149); tra il 41% e il 45% nel 28,9% delle scrofaie (43/149); e maggiore del 46% nel 16,8% delle scrofaie (25/149) (Grafico 1).
Il 53,7% (80/149) delle scrofaie utilizza una rimonta esterna, il 39,6% (59/149) ha una rimonta interna e il 6,7% (10/149) una rimonta mista (interna + esterna).

L'età di arrivo delle scrofette è stata presa in considerazione solamente nelle scrofaie con rimonta esterna o mista (90 allevamenti) e il 55,5% (50/90) degli allevamenti accasa scrofette con più di 3 mesi di vita (Grafico 2).
Anche la frequenza di arrivo delle scrofette è stata valutata solo nelle scrofaie con rimonta esterna o mista ed è emerso che il 46,7% (42/90) accasa le scrofette più di 5 volte all'anno (Grafico 3).
Nel survey è stato chiesto di indicare l'età in cui le scrofette entrano effettivamente in scrofaia (preparazione alla fecondazione); dai risultati emerge che le scrofette vengono portate in scrofaia ad un'età media di 199,9±27,3 giorni e la prima copertura avviene ad un'età media di 239,8±51 giorni. Dai seguenti dati si può quindi risalire all'età delle scrofette al primo parto, che è di 355 giorni di media.
Il 73,2% degli allevamenti (109/149) utilizza un locale quarantena per l'acclimatamento delle scrofette. Riguardo la gestione del locale quarantena il 31,2% (34/109) pratica una gestione tutto pieno/tutto vuoto (AI/AO), il 36,7% (40/109) utilizza una gestione a flusso continuo (CF) mentre il 32,1% (35/109) utilizza un sistema misto (AI/AO-CF).

Grafico 1: Percentuali di rimonta totali (grafico a torta) ed in relazione alle dimensioni delle scrofaie (istogramma).
Graph 1: Replacement rate and its distribution in different farm size

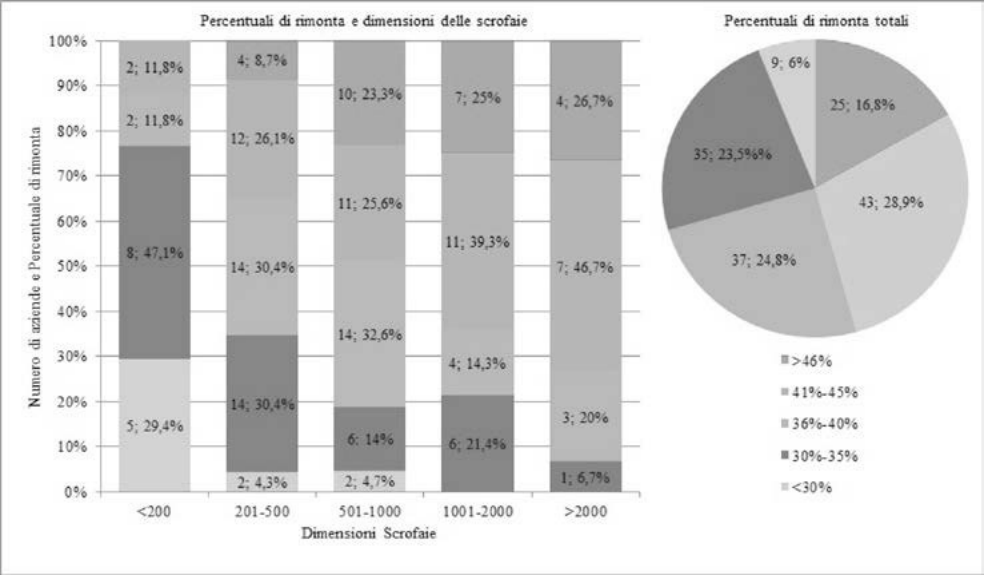


Grafico 2: Età delle scrofette al momento dell'accasamento, in scrofaie con rimonta esterna o mista

Graph 2: Age of incoming gilts in farms with external or mixed replacement source

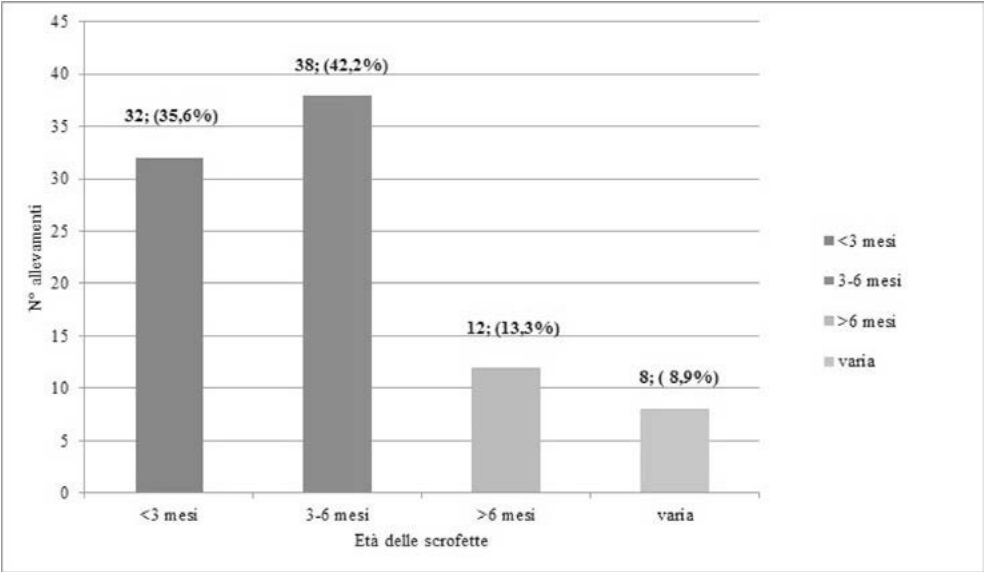
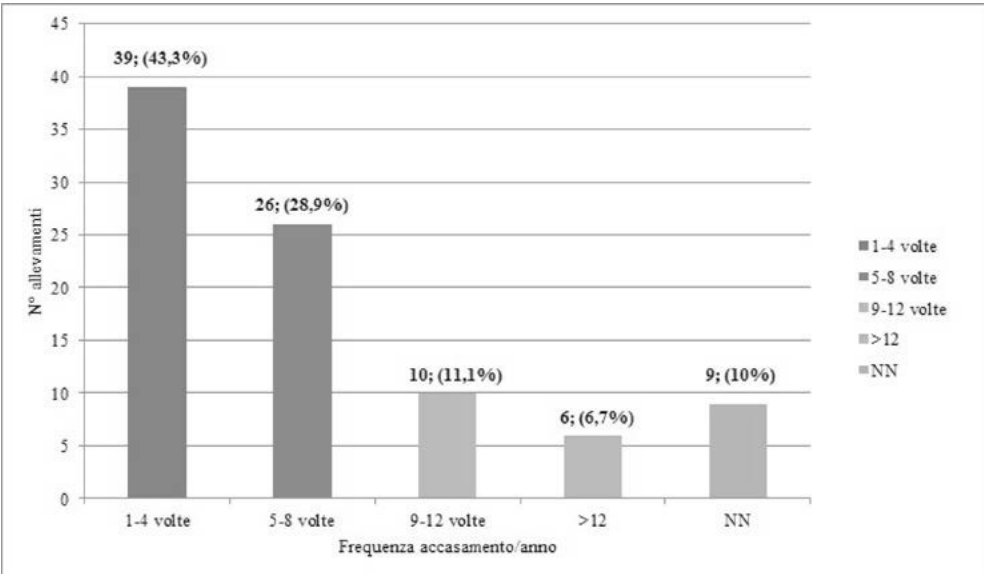


Grafico 3: Frequenza di arrivo delle scrofette, in scrofaie con rimonta esterna o mista

Graph 3: Frequency of gilts arrivals in farms with external or mixed replacement source



Gestione di Mhp

Nel survey è stato chiesto quale fosse lo status Mhp delle scrofette da rimonta, indipendentemente dalla loro origine (rimonta esterna o interna). Dai risultati emerge come l'84,6% (126/149) delle scrofaie introduce rimonta Mhp positiva o non conosce lo status. Andando nel dettaglio delle sole scrofaie con rimonta esterna o mista (90 scrofaie) la percentuale di allevamenti con rimonta Mhp positiva o sconosciuta è del 77,8% (70/90). In totale 23 scrofaie su 149 dichiarano di utilizzare rimonta Mhp negativa, di cui 3 allevamenti con rimonta interna e 20 allevamenti con rimonta esterna o mista (Tabella 3).

Tabella 3: Correlazione tra status Mhp delle scrofette e tipologia di rimonta

Table 3: Correlation between gilts Mhp status and type of replacement source

	Rimonta esterna o mista		Rimonta interna	
Status Mhp	N°	%	N°	%
Positivo	42	46,7%	45	76,3%
Sconosciuto	28	31,1%	11	18,6%
Negativo	20	22,2%	3	5,1%
Totale:	90	100%	59	100%

Tra gli allevamenti che utilizzano rimonta esterna o mista l'81,1% (73/90) riceve scrofette già vaccinate contro Mhp. Nell'89,9% (134/149) degli allevamenti non avviene un controllo dello status Mhp delle scrofette all'arrivo. Durante la fase di accrescimento, 23 allevamenti su 149 (15,4%) dichiarano di vedere segni clinici di malattia respiratoria. Considerando i soli allevamenti con rimonta esterna o mista (90 allevamenti) il 15,6% (14/90) ha problematiche respiratorie nelle scrofette in accrescimento, 13 dei quali con rimonta Mhp positiva o sconosciuta. Inoltre il 40,9% degli allevamenti (61/149) utilizza antibiotici contro forme respiratorie durante l'accrescimento delle scrofette, ma solamente 11 di questi dichiarano di avere problematiche respiratorie durante la fase di accrescimento. Il 24,2% (36/149) delle scrofaie utilizza un acclimatemento specifico per Mhp (lattoni, scrofe vecchie, vaccinazione), ma in realtà ad una domanda diretta relativa all'utilizzo di una vaccinazione contro Mhp nelle scrofette pre-copertura, il 36,2% (54/149) degli allevamenti dice di utilizzarla; il 90,6% (135/149) degli allevamenti non verifica l'efficacia dell'acclimatemento. Infine, riguardo alle strategie vaccinali per gestire Mhp, il 96% (143/149) degli allevamenti non utilizza vaccini contro Mhp sulle scrofe, mentre il 95,3% (142/149) degli allevamenti vaccina i lattoni; il 58,4% (83/142) utilizza un vaccino contro Mhp monodose, il 29,6% (42/142) utilizza un vaccino doppia dose, mentre il 12% (17/142) dichiara di vaccinare i lattoni ma non dice quale strategia vaccinale utilizza. Solo il 4,7% (7/149) degli allevamenti non vaccina i lattoni mentre l'89,9% (134/149) degli allevamenti dichiara di non valutare la presenza di Mhp nei suinetti sottoscrofa.

DISCUSSIONE

Lo scopo della presente indagine è stato quello di valutare le strategie utilizzate nella gestione della rimonta in Italia e più in particolare la gestione delle scrofette nei confronti di Mhp, per poter meglio approcciare la gestione del patogeno in allevamento. Il campione di aziende coinvolte può essere considerato rappresentativo della distribuzione e della demografia delle scrofaie italiane, essendo stati raccolti i dati di circa 130.000 scrofe nelle regioni con maggior densità suinicola, di diverse dimensioni e tipologie.

Se si considerano le scrofette come potenziale fonte d'infezione per i suinetti, dai risultati del survey, emergono alcuni fattori di rischio da prendere in considerazione nella gestione della rimonta in Italia: un alto tasso di rimonta (il 45,6% delle scrofaie ha una rimonta maggiore del 41%) e una frequenza di accasamento elevata, rende complicato lo sviluppo di un protocollo di acclimatamento, non solo per Mhp. In Europa [12] il 77,2% degli allevamenti accasa scrofette più di 5 volte all'anno.

Un altro fattore di rischio è lo status Mhp delle scrofette all'arrivo, poiché il 77,8% delle scrofaie con rimonta esterna o mista, accasa scrofette Mhp positive o con status sconosciuto. Negli Stati Uniti tale percentuale è del 55% mentre in Europa del 90% [10,12]. Considerando l'età di arrivo delle scrofette (55,5% con più di 3 mesi di vita), lo status Mhp positivo della rimonta, l'età media al primo parto (355 giorni) e la lunga durata d'infezione di Mhp [7], è necessario prestare particolare attenzione alla gestione dell'infezione nelle scrofette in accrescimento, per ridurre la trasmissione del patogeno in sala parto ai suinetti.

Un segnale della circolazione di Mhp durante l'accrescimento delle scrofette è che il 15,6% degli allevamenti dichiara di vedere segni clinici di malattia respiratoria e che il 40,9% degli allevamenti utilizza trattamenti antibiotici contro patogeni respiratori.

Riguardo alle strategie di gestione della rimonta c'è da considerare come fattore di rischio, il mancato controllo dello status sanitario all'arrivo delle scrofette (89,9% degli allevamenti) e la non verifica dell'acclimatamento/status prima di entrare in scrofaia (90,6% degli allevamenti). Dai risultati infine emerge che la pratica di acclimatamento più utilizzata è la vaccinazione delle scrofette pre-copertura (36,2% degli allevamenti), anche se in percentuale più bassa rispetto ad altri stati (USA 94% Europa 75,7% Spagna 62,5%) [10-12]. La prevalenza di Mhp sottoscrofa è valutata solo nel 10,1% degli allevamenti ma la vaccinazione sui suinetti è largamente praticata (95,3%).

CONCLUSIONI

Col presente lavoro si è cercato di dimostrare che nella gestione di Mhp è importante considerare le scrofette come potenziale fonte d'infezione dei suinetti in sala parto; in Italia è stata descritta la presenza di Mhp in suinetti allo svezzamento, con una prevalenza del 22,1% [13]. Tenendo quindi in considerazione che i suini possono rimanere infetti per Mhp fino a 214 giorni post-infezione [7] e che in Italia le scrofette sono per la maggior parte Mhp positive, si dovrebbero valutare attentamente le strategie di acclimatamento verso tale patogeno, monitorarne il successo per gestire la circolazione del patogeno nei suini in accrescimento.

Le raccomandazioni che possono scaturire da questo lavoro sono di prendere in considerazione il ruolo delle scrofette da rimonta nella gestione di Mhp, verificare lo status delle scrofette in entrata, gestire al meglio i flussi della rimonta, predisporre un protocollo di acclimatamento adeguato a Mhp e valutare la prevalenza di Mhp sottoscrofa, per gestire al meglio il programma vaccinale dei suinetti e la patologia in tutto l'allevamento.

Ringraziamenti

Si ringraziano tutti i 122 colleghi che hanno attivamente aderito a questa indagine.

BIBLIOGRAFIA

1. Thacker EL, Minion FC. Mycoplasmosis. In: Zimmerman JJ, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. Diseases of Swine. Tenth Edit ed. Ames:Wiley-Blackwell; 2012. p. 779–98.
2. Nathues H, Fournie G, Wieland B, Pfeiffer DU, Staerk KDC. Modelling the within-herd transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in closed pig herds. Porcine Health Manag. 2016;2:10.

3. Sibila M, Nofrarias M, López-Soria S, Segalés J, Riera P, Llopart D, et al. Exploratory field study on Mycoplasma hyopneumoniae infection in suckling pigs. Vet Microbiol. 2007;121:352–6.
4. Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J. Effect of Mycoplasma hyopneumoniae colonization at weaning on disease severity in growing pigs. Can J Vet Res. 2007;71:195–200.
5. Calsamiglia M, Pijoan C. Colonisation state and colostral immunity to Mycoplasma hyopneumoniae of different parity sows. Vet Rec. 2000;146:530–2.
6. Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, De Kruif A. Quantification of the spread of Mycoplasma hyopneumoniae in nursery pigs using transmission experiments. Prev Vet Med. 2004;66:265–75.
7. Pieters M, Pijoan C, Fano E, Dee S. An assessment of the duration of Mycoplasma hyopneumoniae infection in an experimentally infected population of pigs. Vet Microbiol. 2009;134:261–6.
8. Pieters M, Fano E. Mycoplasma hyopneumoniae management in gilts. Vet Rec. 2016;178:122.1–123.
9. Centeno N, Chévez J, Fano E. Mexican swine industry survey on Mycoplasma hyopneumoniae gilts acclimation. Proc IPVS 2016; 241.
10. Fano E, Payne B. Mycoplasma hyopneumoniae gilt acclimation and sow herd stability: Essentials to the systematic control approach. Proc AASV. 2015;46:175–178.
11. Rodríguez-Vega V., Figueras-Gourgues S., Hernández-Caravaca I, Diaz E., Fano E. Survey of the Spanish swine industry on Mycoplasma hyopneumoniae acclimation of gilts. Proc ESPHM 2017; 182.
12. Garza-Moreno et al. Survey on Mycoplasma hyopneumoniae gilt acclimation practices in Europe. Porcine Health Management (2017) 3:21.
13. Villarreal I., Vranckx K., Duchateau L., Pasmans F., Haesebrouck F., Jensen J.C., Nanjiani I.A., Maes D. Early Mycoplasma hyopneumoniae infections in European suckling pigs in herds with respiratory problems: detection rate and risk factors. 2010 Veterinary Medicine. 55(7). p.318-324.

**STUDIO LONGITUDINALE E VARIABILITA' GENOTIPICA DI
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN EPISODI DI MALATTIA
RESPIRATORIA IN SUINI ALL'INGRASSO**

***LONGITUDINAL STUDY AND GENETIC VARIABILITY OF
MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE IN RESPIRATORY
OUTBREAKS IN FATTENING PIGS***

TONNI M., GUARNERI F., GIACOMINI E., PITOZZI A., LAZZARO M., SCALI F.,
BONIOTTI B., ALBORALI G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia;

Parole chiave: Complesso malattia respiratoria nel suino, suini all'ingrasso, *Mycoplasma hyopneumoniae*, variabilità genotipica, MLVA.

Key words: Porcine Respiratory Disease Complex, fattening pigs, *Mycoplasma hyopneumoniae*, genetic variability, MLVA.

Riassunto: L'obiettivo dello studio è quello di valutare la dinamica dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) in episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso e caratterizzare la variabilità genetica dei ceppi circolanti. Sono stati esaminati in totale 750 suini provenienti da episodi di malattia respiratoria riscontrati in 5 allevamenti da ingrasso. In ogni episodio sono stati testati 30 suini per la ricerca di M. hyo dapprima al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria, successivamente in fase di convalescenza dopo 4 settimane mediante prelievo di tamponi tracheobronchiali e in fine al momento della macellazione prelevando i polmoni. I campioni sono stati testati mediante RealTime PCR per rilevare la presenza di M. hyo. Un totale di 314 campioni positivi sono stati caratterizzati mediante Multi Locus Variable-number tandem-repeat Analyses (MLVA). L'analisi MLVA è stata eseguita tramite amplificazione delle regioni genomiche Locus 1, Locus 2, p 97-1 e p 97-2. Un'elevata prevalenza di M. hyo in suini all'ingrasso è stata riscontrata al momento della sintomatologia (88%) che è ulteriormente aumentata in fase convalescente (91%). Al momento della macellazione il 64% dei polmoni presentava lesioni e l'83% dei lobi con lesione è risultato positivo per RealTime PCR. La caratterizzazione dei campioni positivi con MLVA ha identificato un totale di 22 ceppi diversi e la presenza di più di un ceppo per allevamento. È stata osservata anche la presenza di più ceppi nello stesso animale. I risultati di questo studio evidenziano che la circolazione di M. hyo in episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso è elevata pur variando in funzione dell'allevamento. Inoltre, la variabilità genetica di M. hyo evidenziata nei diversi allevamenti con focolai di malattia respiratoria suggerisce che la diversità può essere specifica per ogni allevamento.

Abstract: The aim of this study is to assess the infection dynamic of *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo) in outbreaks of respiratory disease in fattening pigs and to characterize the genetic diversity of the strains. A total of 750 fattening pigs were selected from respiratory outbreaks from 5 farms. In each outbreak 30 pigs were tested for M. hyo at the time of the appearance of respiratory clinical signs, in the convalescent phase after 4 weeks by tracheobronchial swabs (TBS) and at slaughterhouse by lung sampling. Samples were tested by RealTime PCR to detect the presence of M. hyo. A total of 314 samples were further characterized by Multiple Locus Variable-number tandem repeats Analysis

(MLVA) using amplification of Locus 1, Locus 2, p 97-1, p 97-2. High prevalence of *M. hyo* in fattening pigs was detected at the beginning of outbreak (88%) which increased after 4 weeks (91%). At slaughterhouse, 64% of lungs showed lesions and the 83 % of lobes with lesions was RealTime PCR positive. The characterization of *M. hyo* showed a total of 22 genetic variants and the circulation of more than one strain in each farm. Moreover, different strains have been observed even in the same animal.

The results of this study showed that circulation of *M. hyo* in fattening pigs in outbreaks of respiratory disease is high and varied among farms. In addition, the molecular variability of *M. hyo* detected within farms with respiratory outbreaks suggests that genetic diversity could be farm-specific.

INTRODUZIONE

Mycoplasma hyopneumoniae (*M. hyo*) è l'agente eziologico della polmonite enzootica del suino, patologia diffusa in tutte le aree in cui è presente la suinicoltura a carattere intensivo e che causa ingenti perdite economiche dirette ed indirette legate rispettivamente ai costi di medicazione ed al peggioramento delle performance produttive (D. Maes et al., 2008).

M. hyo svolge un ruolo importante nel complesso della Malattia Respiratoria del Suino (PRCD) soprattutto nell'allevamento del suino all'ingrasso (C. Fablet et al., 2012) (M.S. Hansen et al., 2010). La ricerca dei microrganismi che caratterizzano la PRCD e quindi di *M. hyo* è fondamentale per il suo controllo (L. Thacker 2004). I campioni maggiormente diagnostici sono quelli prelevati dalle vie aeree inferiori (C. Fablet et al., 2010) mediante tamponi tracheobronchiali (TBS) oppure lavaggi broncoalveolari (BALF). Utile risulta poi essere la diagnosi anatomopatologica, individuando le cosiddette lesioni *Mycoplasma-like* a livello dei lobi polmonari cranio ventrali, anche se non patognomoniche. La diagnosi di certezza è sempre possibile grazie alla sensibilità della RT PCR che permette di individuare anche poche copie genomiche del microrganismo (L. Thacker 2004).

La valutazione delle lesioni polmonari in sede di macellazione è molto utile, perché oltre a offrire informazioni di tipo ispettivo, fornisce indicazioni per lo studio epidemiologico (M. Sibilia et al., 2007, 2009) permettendo anche l'evidenziazione delle forme subcliniche con il relativo impatto sulle strategie di controllo.

Il genoma di questo microrganismo è caratterizzato da una certa variabilità genomica, proteomica e di virulenza, che ne permettono un miglior adattamento all'ospite (K. Vranckx et al., 2011). In particolare, alcune regioni genomiche, come quella codificante la proteina P97, deputata all'adesione di *M. hyo* con l'epitelio dell'apparato respiratorio dell'ospite, contiene DNA minisatellite ipervariabile detto VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats). Sulla base di questa caratteristica è stata messa a punto la tecnica di genotipizzazione batterica MLVA (Multi Locus Variable-number tandem-repeat Analyses) che consente la rapida individuazione dei diversi genotipi esistenti (K. Vranckx et al., 2011). In letteratura è riportata la presenza di genotipi diversi circolanti nella stessa area geografica e addirittura isolati nello stesso soggetto (L.G. Pantoja et al., 2016) (L.F. Dos santos et al., 2014). Meno conosciuti sono gli aspetti legati alla virulenza dei diversi genotipi che circolano all'interno di un allevamento e le ripercussioni sulle lesioni evidenziate al macello nei lobi polmonari.

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare la dinamica dell'infezione da *M. hyopneumoniae* e caratterizzare la variabilità genetica tra i ceppi evidenziati in 5 episodi di malattia respiratoria in suini all'ingrasso.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Tra il 2016 e il 2017 sono stati individuati 5 allevamenti del nord Italia in cui si è verificato un episodio di patologia respiratoria. Al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria, prima dell'inizio della terapia antibiotica, in ogni allevamento sono stati identificati tramite marca auricolare 30 suini selezionando soggetti sia con sintomatologia clinica che conviventi o nei box vicini. In ogni suino identificato è stato eseguito un duplice campionamento con prelievo di tamponi tracheobronchiali (TBS): al momento della comparsa della sintomatologia (1°prelievo) e 4 settimane più tardi (2° prelievo), contemporaneamente sono stati sottoposti a prelievo di sangue per una valutazione sierologica. Inoltre gli stessi animali sono stati seguiti alla macellazione e di ognuno sono stati prelevati i polmoni. In ogni allevamento sono stati prelevati 150 TBS e 30 polmoni

Prelievo dei campioni

Gli allevamenti inclusi nello studio sono stati selezionati in funzione della comparsa di sintomatologia respiratoria caratterizzata da tosse e dispnea che interessava suini all'ingrasso di età superiore a 5 mesi.

Ogni soggetto identificato è stato contenuto tramite torcinaso e l'apertura delle fauci mantenuta grazie all'applicazione di un morso apribocca che ha permesso il prelievo di TBS. La pratica di campionamento prevede l'utilizzo di una sonda monouso in plastica flessibile della lunghezza di circa 60cm (PORTEX® Catheter, Smiths medical ASD, Inc.) che viene inserita nell'adito laringeo al momento di apertura dell'epiglottide e viene poi fatto scivolare lungo l'albero respiratorio fino alla biforcazione bronchiale.

Dopo pochi secondi il tampone viene estratto ed il tratto terminale di 5cm inserito in una provetta sterile preventivamente riempita con 2ml di terreno di trasporto. I campioni ottenuti sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione e trasportati in laboratorio il giorno stesso. Contestualmente all'esecuzione dei TBS è stato anche prelevato un campione ematico da tutti i suini, per la verifica della risposta anticorpale.

I polmoni dei suini inclusi nello studio sono stati prelevati in sede di macellazione e successivamente trasportati, mantenendoli a 4°C, alla sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER) per l'attribuzione del punteggio polmonare. Dai lobi polmonari che mostravano lesioni *Mycoplasma-like* è stato fatto un campionamento di 1g successivamente omogenato in 10 ml di PBS solution.

Indagini di laboratorio

La ricerca di *M. hyo* è stata eseguita mediante Realtime PCR con l'amplificazione di una regione del gene P102. Da ogni campione ottenuto con tampone bronchiale ed omogenato polmonare è stata prelevata un'aliquota di 1ml, sottoposta all'estrazione del DNA batterico tramite l'utilizzo del kit Qiagen® DNA easy blood and tissue kit (Qiagen®, CA, USA) secondo le indicazioni del produttore e con eluizione finale in 100 µl.

La presenza di *M. hyopneumoniae* è stata evidenziata mediante Realtime PCR realizzata in un volume finale di 25µl ottenuti con 12,5 µl di 2X Go Taq Probe qPCR Mastermix (Promega®), 0,5 µM di ogni primer (5' GTCAAAGTCAAAGTCAGCAAAC 3' e 5' AGCTGTTCAAATGCTTGTC 3'), 0,2 µM di sonda P102, 1,75µl Exo IPC Mastermix, 0,15µl Exo IPC DNA, e 5µl di template, utilizzando le condizioni di amplificazione descritte da Marois et al. (2010). I campioni sono considerati positivi con un quantification cycle (Cq) ≤37 e successivamente sottoposti a tipizzazione genomica.

Nei soggetti in cui la PCR è risultata positiva per *M. hyopneumoniae* è stata eseguita la

caratterizzazione molecolare tramite amplificazione dei loci Locus 1, Locus 2, p 97-1 e p 97-2 (Charlebois et al., 2014). In un volume finale di 25µl, 5µl di DNA vengono amplificati in presenza di 0,2 mM dNTPs, 2 mM MgCl2, 0,2 µM di ciascun primer 1X PCR Buffer II e 1u TaqGold DNA Polimerasi (Applied Biosystem) alle seguenti condizioni di amplificazione: denaturazione di 10 min a 95°C seguiti da 40 cicli a 30 sec 95°C, 30 sec 55°C, 1 min 72° ed un'estensione finale di 7 min 72°C. La dimensione dei prodotti PCR amplificati viene ottenuta tramite elettroforesi capillare (Qiaxcel, Qiagen®) in presenza di marcatori di peso molecolare. Il peso molecolare corrisponde ad n° di ripetizioni della sequenza contenuta nel singolo locus genico. L'insieme del numero di ripetizioni dei 4 loci esaminati costituisce il profilo genico/genotipo dello stesso e viene indicato con un numero

I campioni di siero sono stati testati per la presenza di anticorpi contro la proteina P46 di M hyo mediante ELISA indiretta (ID.vet® *M. hyopneumoniae* indirect kit, Grabels, France) considerando positivi quelli con rapporto S/P >0,4.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Negli allevamenti A, D ed E la prevalenza della positività per PCR è del 100% mentre negli allevamenti B e C è elevata anche se inferiore (rispettivamente 63 e 87 %) (Tabella 1). La prevalenza della positività in TBS del prelievo in fase di convalescenza è uguale o superiore rispetto al 1° prelievo in tutti gli allevamenti eccetto nel B.

La percentuale di polmoni che presentavano lesioni al macello è risultata particolarmente elevata negli allevamenti A, C, D, ed E. Nell'allevamento B la percentuale è risultata inferiore (37%). Nei lobi polmonari con lesioni la positività alla PCR è risultata elevata (83%). Questo potrebbe essere legato alla differente dinamica di circolazione di M. hyo in allevamenti con gestione differente in termini di flusso di animali e condizioni sanitarie dell'allevamento da riproduzione di provenienza. Nell'allevamento B infatti erano presenti contemporaneamente animali di pesi diversi che sono stai macellati a distanza superiore a 2 mesi.

Tabella 1. Risultati RealTime PCR in TBS e lobi polmoni per singolo allevamento

allevamento	1° prelievo	2°prelievo	polmoni con score >1	lobi con lesioni / lobi polmoni score >1	PCR + / lobi con lesioni
A	30/30	30/30	25/30	84/175	82/84
B	20/30	18/30	11/30	19/77	16/19
C	22/30	30/30	22/30	58/154	37/58
D	30/30	30/30	18/30	47/126	30/47
E	30/30	18/18	14/20	51/98	51/51
Totale campioni	150	138	140	630	259
Totale positivi	132	126	90	259	216
% positivi	88%	91%	64%	41%	83%

L'indagine sierologica ha evidenziato un incremento della sieropositività (Tabella 2), dal 57% del primo prelievo all'89% nel secondo prelievo dopo 4 settimane. In particolare negli allevamenti A, C, D, si è osservata una netta sieroconversione mentre negli allevamenti B e E la percentuale dei soggetti positivi si presentava elevata sin dal primo prelievo. Tale situazione potrebbe essere legata al fatto che in questi ultimi allevamenti la circolazione di M. hyo fosse precedente all'inizio della sintomatologia.

Tabella 2. Sieropositività di M. hyo al momento della comparsa della sintomatologia e 4 settimane più tardi

	A	B	C	D	E	Totale campioni	Totale positivi	% positivi
1° Prelievo	4/30	20/30	18/30	15/30	28/30	150	85	57%
2° Prelievo	26/30	21/30	29/30	29/30	19/20	140	124	89%

Di seguito vengono riportati i risultati della caratterizzazione molecolare dei ceppi di M. hyo ottenuti in TBS e lobi polmonari appartenenti ai suini dei 5 allevamenti inclusi nello studio (Tabella 3).

Tabella 3. Risultati della caratterizzazione molecolare dei ceppi di M. hyo evidenziati in TBS e polmoni

		Allevamento				
		A	B	C	D	E
genotipi	1° Prelievo	5	1	2	4	1
	2° Prelievo	4	1	2	5	2
	Polmoni	3	6	5	3	2
	Totale	6	>6	6	6	2
animali	1 solo ceppo (1° Prelievo)	24/30	15/15	16/20	26/28	29/29
	più di 1 ceppo (1° Prelievo)	4/30	0/15	4/20	2/28	0/29
	1 solo ceppo (2° Prelievo)	15/30	12/12	21/27	26/28	18/18
	più di 1 ceppo (2° Prelievo)	5/30	0/12	6/27	2/28	0/18
polmoni	1 solo ceppo	7/24	2/8	10/21	8/10	9/14
	più di 1 ceppo	17/24	6/8	12/21	2/10	5/14

Sono stati identificati un totale di 22 varianti genetiche. In 4 allevamenti si osserva la circolazione di 6 o più ceppi geneticamente diversi mentre nel 5° allevamento sono stati rilevati solo 2 ceppi. In 23 TBS e 42 polmoni sono stati rilevati ceppi diversi provenienti dallo stesso animale o dallo stesso lobo polmonare. Questa situazione si verifica in particolari nei polmoni di animali di allevamenti A, B e C.

Nell'allevamento B, C ed E al momento della comparsa della sintomatologia è stato osservato un numero limitato di ceppi (1-2). Nei polmoni è stato evidenziato un numero superiore di ceppi (5-6) in tutti gli allevamenti eccetto che per l'allevamento E dove la macellazione è avvenuta dopo 3 settimane dall'inizio del focolaio. Inoltre va sottolineato che nell'allevamento B i primi 20 polmoni presentano un unico ceppo mentre negli ultimi 10 sono stati osservati > 6 ceppi. In questo allevamento peraltro gli animali sono stati macellati in due momenti diversi: i primi 20 dopo 8 settimane dal focolaio e gli ultimi 10 dopo 16 settimane.

Negli allevamenti C ed E, 3 dei ceppi osservati sono comuni indicando la circolazione degli stessi ceppi tra allevamenti diversi.

CONCLUSIONI

I risultati delle PCR su TBS eseguiti su suini al momento della comparsa della sintomatologia respiratoria indicano che *M. hyo* è coinvolto in maniera importante nei focolai inclusi nello studio. L'elevata sieroprevalenza riscontrata dopo 4 settimane dal momento della segnalazione del focolaio conferma ulteriormente l'elevata circolazione di *M. hyo* nei focolai. Per quanto riguarda la variabilità genotipica è stato osservato che il numero dei ceppi coinvolti varia da allevamento ad allevamento e che nello stesso animale possono essere presenti più ceppi, in accordo con quanto riportato in letteratura (A. Michiels et al., 2017). Solo recentemente è stata segnalata l'associazione tra gravità dell'infezione da *M. hyo*, numero di ceppi circolanti e intensità delle lesioni polmonari (A. Michiels et al., 2017). È importante sottolineare che, come noto, sono numerosi i fattori che possono influenzare la gravità della sintomatologia respiratoria nei suini all'ingrasso e successivamente delle lesioni polmonari riscontrate al macello. L'ampliamento delle indagini ad altri episodi di malattia respiratoria in suini in accrescimento e ulteriori approfondimenti in merito alle caratteristiche ed alla gestione dell'allevamento, alle misure di biosicurezza e alla presenza di co-patogeni consentiranno di migliorare le conoscenze in merito alla dinamica dell'infezione anche in suini pesanti.

BIBLIOGRAFIA

- Fablet C., Marois C., Kobisch M., Madec F., Rose N., (2010). Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach. Vet. Microbiology 143 238–245
- Fablet C., Marois-Crehan C., Simon G., Grasland B., Jestin A., Kobisch M., Madec F., Rose N., (2012). Infectious agents associated with respiratory diseases in 125 farrow-to-finish pig herds: A cross-sectional study. Vet. Microbiology 157 152–163
- Hansen M. S., Pors S.E., Jensen H.E., Bille-Hansen V., Bisgaard M., Flachs E.M., Nielsen O.L., (2010). An Investigation of the Pathology and Pathogens Associated with Porcine Respiratory. J. of Comp. Pathology Vol. 143 120-131
- Madec, F., and M. Kobisch, (1982). Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. Journ. Rech. Porc. Fr. 14, 405–412.
- Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F., (2008). Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Vet. Microbiology 126, 297–309.
- Marois, C., Dory, D., Fablet, C., Madec, F., Kobisch, M., (2010). Development of a quantitative Real-Time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose

of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. J. Appl. Microbiol. 108(5), 1523-33

- Michiels A., Vranckx K., Piepers S., Del Pozo Sacristán S., Arsenakis I., Boyen F., Haesebrouck F., Maes D., (2017). Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs. Vet. Res. 48:2
- Sibila M., Nofrarí M., Lo'pez-Soria S., Segale J., Valero O., Espinal A., Calsamiglia M., (2007). Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. Vet. Microbiology 122 97–107
- Sibila M., Pieters A., Molitor T., Maes D., Haesebrouck F., Segale's J., (2009). Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection The Vet. Journal 181 221–231
- Thacker E. L., (2004). Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. Animal Health Research Rev. 5(2) 317–320
- Vranckx, K., Maes D., Calus D., Villarreal I., Pasmans F., Haesebrouck F., (2011). Multiple locus variable number of tandem repeats analysis is a suitable tool for the differentiation of *M. hyopneumoniae* strains without cultivation. J. Clin. Microbiol. 49, 2020–2023.

DINAMICA DELL'INFEZIONE DA *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN SCROFETTE DA RIMONTA IN 3 ALLEVAMENTI DI TIPO COMMERCIALE

INFECTION DYNAMICS OF *MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE* IN REPLACEMENT GILTS IN 3 COMMERCIAL HERDS

GIBELLINI M.¹, ROSSI R.², FERRO P.¹, PITOZZI A.³, TROGU E.⁴, FUSCO L.⁴, FORESTI F.⁴,
TURCO G.⁴, BONIOTTI B.³, ALBORALI G.L.³

¹ Elanco Italia S.p.a. - ² Università degli studi di Milano - ³ Istituto Zooprofilattico
Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
⁴ Medico Veterinario Libero Professionista

Parole chiave: *Mycoplasma hyopneumoniae*, scrofette, dinamica infezione

Key words: *Mycoplasma hyopneumoniae*, gilts, infection dynamics

Riassunto: La trasmissione di *Mycoplasma hyopneumoniae*, agente eziologico della polmonite enzootica, avviene prevalentemente per contatto diretto. Nonostante il problema sia maggiormente apprezzabile nei suini in fase di accrescimento-ingrasso, il contatto tra scrofa escrettrice e suinetto gioca un ruolo chiave nel mantenimento dell'infezione in allevamento. In particolare le scrofette e le scrofe giovani rappresentano un fattore di criticità per la trasmissione del *Mycoplasma hyopneumoniae* in sala parto. Scopo di questo studio è stato quello di valutare la presenza, la dinamica e la persistenza dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* nelle scrofette da rimonta.

168 scrofette provenienti da 3 allevamenti positivi per *Mycoplasma hyopneumoniae* sono state selezionate e testate nel corso dello studio. Tamponi tracheo-bronchiali e prelievi ematici sono stati effettuati a 110, 150, 180, 210, 270, 330 e 360 giorni di vita. 52 tamponi su 164 sono risultati positivi mentre la sierologia ha evidenziato una sieroprevalenza variabile nel corso degli intervalli di tempo valutati. Le scrofette oggetto dello studio sono risultate naturalmente infettate con *Mycoplasma hyopneumoniae* per un minimo di 2 mesi ad oltre 160 giorni. Inoltre è stata osservata l'estensione dell'infezione tardiva fino alla sala parto, fattore di rischio importante per il protrarsi della patologia in allevamento.

Abstract: *Mycoplasma hyopneumoniae* is prevalent transmitted by direct contact; despite pathology is mainly impactful in fattening unit, the direct contact between piglets and their dams play a crucial role for the persistence of the microorganism in the herd. Gilts and young sows represent a critical factor for *Mycoplasma* transmission in farrowing unit. The aim of the study was to assess detection, dynamic and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in replacement gilts. 168 gilts from three commercial herds positive for *Mycoplasma hyopneumoniae* were selected and tested during the study. Tracheobronchial swabs and blood were collected at 110, 150, 180, 210, 270, 330 and 360 days of age. Positive swabs were founded in 52 out of 164 evaluated; seroprevalence was variable during the observed time. The study has shown that naturally infected gilts are positive for a minimum of 2 months for more than 160 days post infection. If infection occurs late during acclimation the possibility to have shedders in farrowing unit is high and this can compromise the herd health status.

INTRODUZIONE:

Mycoplasma hyopneumoniae (*M.hyo*) è l’agente eziologico della Polmonite Enzootica (EP), una patologia respiratoria che colpisce prevalentemente i suini in fase di magronaggio e ingrasso.

Nonostante diverse misure permettano di tenere sotto controllo la patologia (es. vaccinazione, trattamenti antimicrobici), *M.hyo* continua ad avere un ruolo importante nel complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC). Questo a causa della capacità del patogeno di danneggiare l’epitelio tracheo-bronchiale, predisporre a infezioni batteriche secondarie e aumentare la severità delle infezioni virali.

I segni clinici iniziano 10-16 giorni post-infezione e sono caratterizzati da tosse cronica e non produttiva. Le lesioni macroscopiche consistono in aree di consolidamento polmonare grigio-viola, generalmente localizzate a livello dei lobi apicale, medio e cardiaco. La guarigione richiede più di 14 settimane e le lesioni esitano in tessuto cicatriziale interlobulare. Per questo motivo la patologia è associata ad una diminuzione dell’incremento ponderale giornaliero, ad un aumento dell’indice di conversione all’incremento della spesa relativa ai trattamenti e tutto ciò è causa di ingenti perdite economiche.

M.hyo è generalmente trasmesso per contatto diretto e, nonostante la prevalenza della patologia sia maggiore in ingrasso, l’infezione può essere apprezzata anche in svezzamento e sala parto.

La trasmissione verticale non è documentata e la prima esposizione avviene durante la lattazione al momento del contatto diretto dei suinetti con le loro madri.

Per questo motivo scrofe e suinetti sono considerati reservoir dell’infezione da *M. hyopneumoniae* in allevamento e, in conseguenza a questo, la presenza di scrofe giovani e scrofette è correlata positivamente alla presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* nei suinetti.

Per questo le scrofette rappresentano un rischio per l’escrezione del patogeno e il loro acclimatemento deve essere gestito e organizzato in modo da mantenere alto lo stato sanitario dell’allevamento.

Lo scopo dello studio è stato quello di valutare la presenza, la dinamica e la persistenza dell’infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* in scrofette da rimonta entrate naturalmente a contatto con il patogeno in allevamento.

MATERIALI E METODI

ALLEVAMENTI

Lo studio è stato condotto in 3 allevamenti commerciali, situati nel nord Italia con caratteristiche di management differenti per quanto riguarda l’introduzione e la gestione delle scrofette.

Gli allevamenti oggetto di studio erano positivi all’infezione da *M.hyo* in base all’osservazione di sintomi clinici, alla diagnostica di laboratorio in archivio e al rilevamento di lesioni polmonari ascrivibili a polmonite enzootica in sede di macellazione.

ALLEVAMENTO A: Allevamento da 1500 scrofe a ciclo aperto e scrofette acquistate da un moltiplicatore esterno; le scrofette ricevono la profilassi vaccinale per *M.hyopneumoniae* con un vaccino commerciale bi-dose a 7 e 21 giorni di vita ed entrano in allevamento a 80 giorni di vita.

La quarantena è situata all’interno del sito 1, l’acclimatemento inizia al 180mo giorno di vita.

ALLEVAMENTO B: Allevamento da 1500 scrofe a ciclo aperto che acquista scrofette dall’esterno; le scrofette ricevono la profilassi vaccinale per *M.hyopneumoniae* con un

vaccino commerciale bi-dose a 7 e 21 giorni di vita ed entrano in allevamento a 28 giorni di vita.

L’accrescimento è esterno al sito, l’acclimatemento inizia al 220mo giorno di vita.

ALLEVAMENTO C: Allevamento da 300 scrofe a ciclo chiuso; le scrofette sono autoprodotte in allevamento e vaccinate con vaccino commerciale monodose a 21 giorni di vita.

DISEGNO SPERIMENTALE. In ognuno dei 3 allevamenti coinvolti sono state scelte casualmente 56 scrofette appartenenti a 7 diverse fasce di età (110, 150, 180, 210, 270, 330 e 360 giorni di vita).

Ad ogni scofetta è stato effettuato un prelievo ematico e un tampone tracheo-bronchiale. I tamponi tracheo-bronchiali sono stati conservati in provette singole addizionate con 1 ml di soluzione di trasporto. Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione (2-6° C) e trasportati in laboratorio entro 24 ore dal prelievo.

I tamponi tracheo-bronchiali sono stati esaminati mediante qPCR diretta verso il gene p102 of *M.hyo* per valutare la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae*. I campioni di siero sono stati testati per la presenza di anticorpi contro la proteina P46 di *M. hyo* mediante ELISA indiretta (ID.vet® *M. hyopneumoniae* indirect kit, Grabels, France) considerando positivi quelli con rapporto S/P >0,4.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I tamponi tracheo-bronchiali mostrano la presenza e l’avvenuta infezione delle scrofette testate nei tre allevamenti seguenti.

Nell’allevamento A le PCR risultano essere positive per le scrofette di 270 e 330 giorni di vita.

Anche nell’allevamento B le PCR iniziano ad esser positive a 270 giorni e la presenza di *M.hyo* viene rinvenuta fino ai 360 giorni di vita, in sala parto.

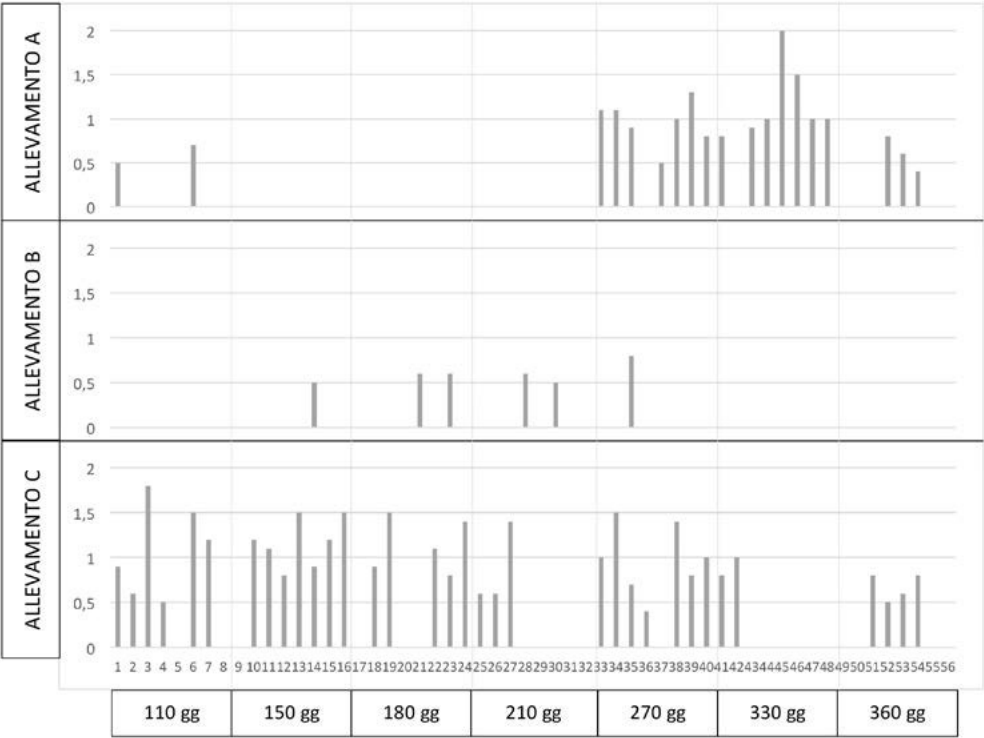
Nell’allevamento C le PCR hanno dimostrato la positività a *M.hyo* in tutte le fasce d’età ad esclusione del gruppo di scrofette di 330 giorni di vita.

L’Elisa ha dato titoli anticorpali variabili all’interno degli intervalli di tempo osservati.

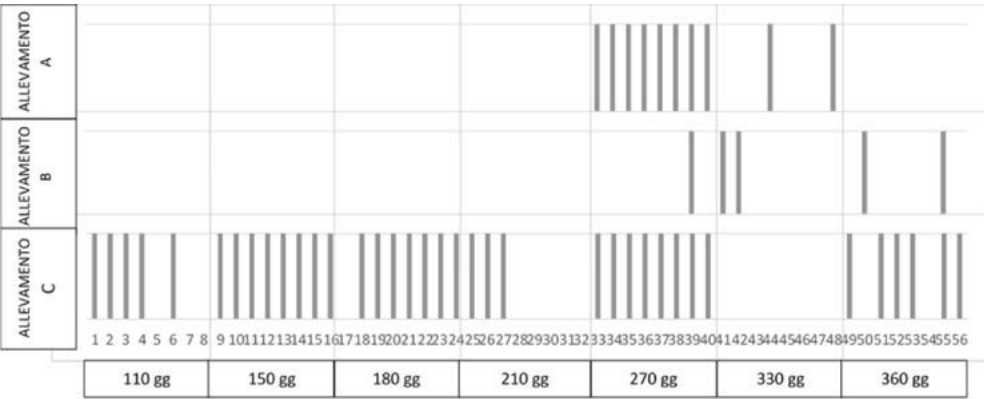
Tab. 1: Risultati Real Time PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae*

	110 gg	150 gg	180 gg	210 gg	270 gg	330 gg	360 gg
ALLEVAMENTO A	-	-	-	-	8/8	2/8	-
ALLEVAMENTO B	-	-	-	-	1/8	2/8	2/8
ALLEVAMENTO C	5/8	8/8	8/8	3/4	8/8	-	5/8

Tab. 2: Risultati test sierologico Elisa per *Mycoplasma hyopneumoniae*



Tab. 3: Risultati Real Time PCR per *Mycoplasma hyopneumoniae* nei tamponi tracheo-bronchiali



I questo studio abbiamo valutato la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* e la dinamica dell'infezione in scrofette da rimonta in 3 allevamenti commerciali utilizzando la ricerca del patogeno mediante Real Time PCR e la ricerca di anticorpi mediante tecnica Elisa.

La presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* è stata confermata a partire dal 270mo giorno di vita in 2 allevamenti, mentre nel terzo allevamento gli animali erano positivi già a 110 giorni di vita.

Nell'allevamento A le scrofette, al momento dell'arrivo, erano negative per *Mycoplasma hyopneumoniae*. I tamponi tracheo-bronchiali non hanno evidenziato la presenza del patogeno nelle vie aeree e l'esame sierologico ha rivelato titoli anticorpali molto bassi in 2 degli 8 soggetti testati.

L'escrezione del patogeno è iniziata, in tutti gli animali testati, al 270mo giorno di vita ed è continuata fino al giorno 330 in 2 soggetti su 8; i titoli anticorpali verso *M.hyo* sono caratterizzati dalla comparsa in concomitanza del ritrovamento del patogeno e dalla persistenza fino a 360 giorni.

Nell'allevamento B le scrofette in entrata erano *Mycoplasma* free. Dopo l'infezione avvenuta in allevamento l'escrezione del patogeno è iniziata a 270 giorni di vita in un animale su 8 e si è protratta fino ai 360 giorni di vita in 2 soggetti su 8 quando gli animali si trovavano in sala parto. I titoli anticorpali si rilevano a partire dal 150mo giorno di vita in 1 solo animale su 8 e persistono fino al 270mo giorno di vita in non più di 2 soggetti degli 8 totali presi in considerazione.

Nell'allevamento C la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* si può apprezzare in tutti i gruppi di soggetti testati ad eccezione dei soggetti di 330 giorni di vita in almeno il 50% dei soggetti valutati.

I titoli sierologici sono importanti in tutte le fasce di età osservate. L'insieme dei risultati indica una circolazione attiva del patogeno in allevamento sino all'ingresso delle scrofette in sala parto.

CONCLUSIONI

Durante lo studio è emerso che in 2 degli allevamenti testati, la presenza di *Mycoplasma hyopneumoniae* persiste fino al momento del parto. Questo rappresenta un fattore di rischio importante perché correlato positivamente al rilevamento di suinetti positivi in sala parto e ad una maggior circolazione del patogeno in magronaggio e ingrasso. Tale fattore di rischio non è presente nell'allevamento A in quanto le scrofette al momento del parto sono PCR negative. I risultati emersi suggeriscono che durante l'acclimatamento delle scrofette è necessario valutare anche lo stato sanitario per *Mycoplasma hyopneumoniae* impostando protocolli di gestione specifici per la situazione osservata.

Tra i metodi diagnostici utilizzati per valutare la presenza e la dinamica dell'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae* la sola sierologia non offre una facile chiave di lettura ma il risultato acquista maggior significato se affiancato al prelievo di tamponi tracheo-bronchiali. Un protocollo di campionamento delle scrofette potrebbe rappresentare uno strumento fondamentale per meglio controllare l'infezione in allevamento migliorando lo stato sanitario anche dei suini in accrescimento

BIBLIOGRAFIA

Calsamiglia M., Pijoan C., 2000. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record*, 146, 530-532.
Fano E., Pijoan C., Dee S., 2005. *Mycoplasma hyopneumoniae* prevalence at weaning as a predictor of the group's subsequent *Mycoplasma* status. *Proceedings of Allen D. Leman Swine Conference 2005*, 109-113.

Fano E., Pijoan C., Dee S. and Torremorell M., 2006. Assessment of the Effect of Sow Parity on the Prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in Piglets at Weaning. Proceedings of 19th International Pig Veterinary Society, Copenhagen, 16-19 July 2006, p. 96.

Garza-Moreno L., Segales J., Pieters M., Romagosa A., Sibila M., 2017. Survey on *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt acclimation practice in Europe. Porcine health management, 3-21.

Giacomini E., Ferrari N., Pitozzi A., Remistani M., Giardiello D., Maes D., Alborali G. L., 2016. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* seroconversion and infection in pigs in the three main production systems. Vet Res Commun 40, 81-88

Maes D., Verdonck M., Deluyker H., de Kruif A., 1996. Enzootic pneumonia in pigs. Vet Q. 18, 104-9

Roos L. R., Fano E., Homwong N., Payne B., Pieters M., 2016. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. Vet Microbiology 184, 51-58.

Straw B. E., Tuovinen V. K., Bigras-Poulin M., 1989. Estimation of cost of pneumonia in swine herds. Food animal economics 195, 1702-1706

Takeuti L. K., De Barcellos D. E. S. N., De Andrade C. P., De Almeida L. L., Pieters M., 2017. Infection dynamics and genetic variability of *Mycoplasma hyopneumoniae* in self-replacement gilts. Vet. Microbiol. 208, 18-24

Takeuti L. K., De Barcellos D. E. S. N., De Lara A. C., Kunrath C. F., 2017. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in naturally infected gilts over time. Vet Microbiology 203, 215-220.

Thacker E. L., Minion F. C., Mycoplasmosis. In: Zimmerman J. J., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., editors. Disease of Swine. Tenth Edit ed. Ames: Wiley-Blackwell; 2012. P. 779-9ù8

EFFETTO SUL BIOFILM AMBIENTALE DI UNA CULTURA MICROBICA APPLICATA NELL'AMBIENTE DELLA SALA PARTO

EFFECT ON THE ENVIRONMENTAL BIOFILM OF A MICROBIAL CULTURE FARROWING ROOM AMBIENCE

BAZZOLI A.¹, PLATEAU J.²

¹Lallemand Animal Nutrition, Italia

²Lallemand Animal Nutrition, Francia

Parole chiave: Biofilm positivo, ambiente microbico, parto.

Key words: Positive biofilm, microbial environment, farrowing

Riassunto: I biofilm hanno un importante impatto su una vasta gamma di aree di applicazione, ad esempio nel campo biomedico umano e nell'industria alimentare inclusa la produzione di materie prime da produzioni zootecniche nonché l'allevamento. Scopo del presente studio è quello di valutare l'effetto di una miscela microbica a base di *Bacillus spp* e *Pediococcus spp.*, nel controllo dello sviluppo e contaminazione del biofilm ambientale in un allevamento suino. Due sale parto di 50 m² e 7 scrofe ciascuna sono state prese in considerazione. Una delle due sale, denominata Trattamento è stata trattata con il prodotto subito dopo la disinfezione mentre la stanza Controllo dopo la disinfezione non ha ricevuto alcun trattamento. Sono stati effettuati un totale di 40 tamponi ambientali per la ricerca di: *Pediococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacteriacee*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp.* I tamponi sono stati effettuati su due differenti superfici (pavimento grigliato e pareti divisorie) in 3 differenti momenti: prima dell'entrata degli animali (T0), 24 ore dopo l'entrata degli animali (T1), e quattro giorni dopo l'entrata (T4). Tra le popolazioni ricercate i pediococchi sono risultati i più presenti e sono stati riscontrati solo nella stanza trattata per entrambe le superfici con differenze significative, rispetto alla stanza controllo a T1 (p= 0.03) e a T4 (p=0.03). Per quanto riguarda le due superfici, il pavimento grigliato è sembrata essere la superficie più contaminata rispetto alle pareti divisorie. In questo caso la stanza controllo aveva una contaminazione maggiore per streptococchi a T4 (p=0.03) e una tendenza a maggior contenuto in stafilococchi sempre a T4 (p= 0.057). Le pareti divisorie non hanno mostrato differenze significative tra i due trattamenti.

Abstract: Biofilms have a strong impact in a large range of areas such as the human biomedical fields and the food industry including the raw material production from livestock and farming. The aim of this study was to test the effects, of a mix of bacteria based on *Bacillus spp.* and *Pediococcus spp.*, on biofilm development and contamination on a swine farm. Two farrowing rooms of 50 m² and 7 sows each were selected. One of the two rooms, called Treatment, received the application of the product just after the disinfection, whereas the Control room after the disinfection did not receive any treatment. A total of 40 environmental swabs were taken to screen the presence of: *Pediococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacteriacee*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* The swabs were applied to two different surfaces (slatted floor and plastic wall) in 3 different times: before animal entrance (T0), 24 hours after animal entrance (T1) and four days after animal entrance (T4). Among the investigated populations, *Pediococcus spp.* was the most relevant and occurred only on treated room on both surfaces, with significant differences, compared to the control room, at T1 (p= 0.03) and at T4 (p= 0.03). Regarding the two surfaces, the slatted floor seems to be more contaminated

compared to the plastic walls. In this case, the control room had a higher contamination of *Streptococcus* spp. at T4 ($p=0.03$) and a trend for higher *Staphylococcus* spp. at T4 ($p=0.057$). The plastic walls did not show any significant differences between two treatments.

INTRODUZIONE:

Lo stato planctonico, ovvero libero, è stato considerato per molto tempo lo stato fisiologico principale in cui è possibile ritrovare i microrganismi nell'ambiente. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che il biofilm è una strategia comunemente utilizzata da molti microrganismi per stabilizzarsi, diffondersi e colonizzare i diversi ambienti. La capacità di formare un biofilm è ora considerata attributo universale dei microrganismi [1]: al mondo oltre il 90% della massa microbica risiede all'interno di un biofilm [2].

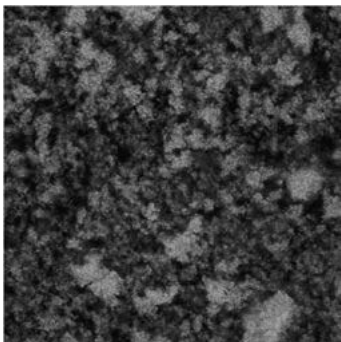
I biofilm hanno un importante impatto su una vasta gamma di aree di applicazione, ad esempio nel campo biomedico umano e nell'industria alimentare inclusa la produzione di materie prime da produzioni zootecniche [3]. Negli anni è stata data scarsa attenzione ai biofilm presenti in allevamento: la maggior parte della ricerca è stata orientata a patologie umane legate a biofilm, in realtà questi sono responsabili di elevate perdite economiche anche all'industria zootecnica [4].

Definizione di biofilm e matrice

Il biofilm viene definito, e generalmente accettato, come comunità strutturata di batteri e/o altri microrganismi: alghe, funghi, immersi in una matrice polimerica autoprodotta ed attaccata ad una superficie inerte e/o viva [5].

Figura 1: Biofilm di *Staphylococcus epidermidis* – microscopia confocale [6].

Figure 1: *Staphylococcus epidermidis* biofilm- confocal microscopy [6].



La matrice polimerica extracellulare è principalmente composta da acqua (più del 97%), esopolisaccaridi, proteine e acidi nucleici. La composizione della matrice inoltre può variare in funzione del tipo di specie di microrganismi ma anche dalle condizioni di crescita [7]. Nella Figura 1 è riportato come esempio un biofilm mono specie di *Staphylococcus epidermidis*.

Formazione del biofilm e dinamiche

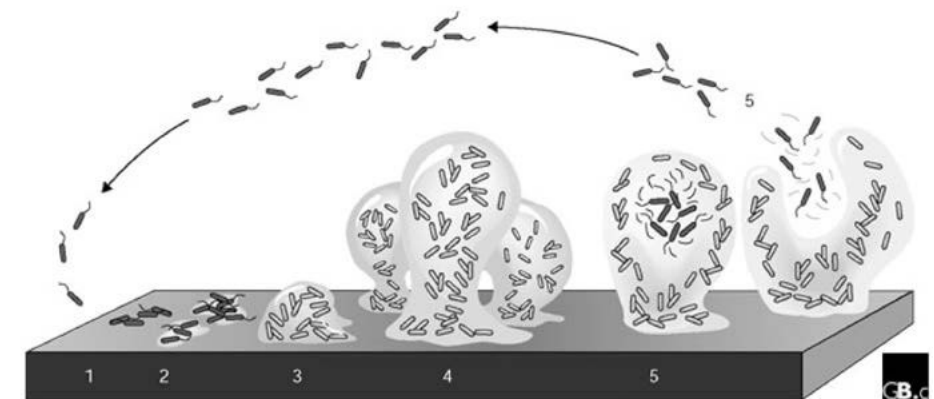
Il processo di formazione di un biofilm è un processo multifase complesso e descritto nella Figura 2. Il modello corrente di formazione di un biofilm è basato su osservazioni ottenute utilizzando diverse specie batteriche.

Figura 2: Fasi del ciclo di un Biofilm [8].

1: Adesione reversibile dei batteri, 2: Adesione irreversibile dei batteri, 3: Prima fase di maturazione, 4: Biofilm completamente maturo con architettura complessa, 5: Dispersione di singole cellule mobili

Figure 2: Biofilm cycle steps [8].

1: Reversible bacteria attachment, 2: Irreversible bacteria attachment, 3: First maturation phase, 4: Fully mature biofilm with complex architecture, 5: Dispersion of single motile cells



Durante le prime fasi di formazione del biofilm, le cellule batteriche che riescono ad aderire irreversibilmente ad una superficie iniziano a formare micro colonie per divisione cellulare; quindi iniziano a produrre una matrice polimerica extracellulare. L'architettura tridimensionale di un biofilm maturo è eterogenea e costituita da canali d'acqua che creano gradienti decrescenti dalla parte esterna del biofilm fino agli strati più profondi, adesi alla superficie di supporto, permettendo così il trasporto di ossigeno e nutrienti [9]. La modalità di crescita dei batteri all'interno di un biofilm è più lenta rispetto alla forma libera, dovuta appunto a questi gradienti di elementi nutritivi e/o all'ossigeno. Inoltre, la fase di dispersione permette a gruppi di microrganismi di staccarsi dal biofilm per mantenersi su di uno specifico ambiente e/o così colonizzare altre superfici, ma la stessa caratteristica può causare infezioni ricorrenti nei casi di malattia [10].

Un'altra interessante caratteristica specifica è la comunicazione "da cellula a cellula" denominata "quorum sensing", un tipo di comunicazione dipendente dalla densità cellulare. Questa caratteristica permette ai batteri di un biofilm di comunicare tra di loro ma anche di organizzare una risposta collettiva agli stimoli dell'ambiente [11]. Piccole molecole chimiche di segnale vengono prodotte e rilasciate nell'ambiente dai batteri. L'aumento di queste molecole di segnale è commensurato alla densità delle cellule nel biofilm. Specifici sensori batterici sono in grado di riconoscere la concentrazione del segnale con conseguente consapevolezza della densità totale all'interno del biofilm. Raggiunta una soglia critica nella concentrazione del segnale, viene attivato simultaneamente un meccanismo di regolazione dell'espressione genetica che porta all'adattamento del comportamento dell'intera popolazione batterica. Il meccanismo è utilizzato nella formazione del biofilm, ma anche in altre fasi della vita microbica ad esempio per indurre simbiosi, virulenza, competenza, coniugazione, produzione di antibiotici, motilità, sporulazione [12]. Recenti progressi nel campo, indicano che la comunicazione "da cellula a cellula" via quorum sensing può avvenire, non solo all'interno della stessa specie, ma anche tra specie diverse.

Importanza dei biofilm in produzione animale

Gli allevamenti animali, per le loro condizioni ambientali, rappresentano dei luoghi favorevoli allo sviluppo di biofilm su ogni tipo di attrezzatura. Questi infatti sono caratterizzati da molteplici superfici con numerose asperità e presenza di umidità, calore e ampia fonte di materiale organico (alimenti, deiezioni, lettiera, ecc.). Inoltre, la presenza di eventuali impianti di ventilazione e degli stessi animali, può contribuire alla disseminazione del biofilm. Anche piccoli animali od insetti provenienti dall'esterno possono introdurre specie diverse di microrganismi e concorrere alla formazione del biofilm.

Nella pratica attuale, le correnti tecnologie abbinate a regolari processi di pulizia e disinfezione permettono di eliminare la maggior parte dei batteri. Tuttavia la matrice del biofilm è considerata uno dei maggiori fattori di resistenza dei batteri grazie alla sua capacità di agire come barriera contro le più diverse aggressioni. Ad esempio esso protegge i differenti strati di batteri, evitando il contatto con gli agenti antimicrobici. E' stato dimostrato che i batteri presenti all'interno di un biofilm, rispetto a batteri presenti in forma libera, sono da 10 a 1000 volte più resistenti agli antimicrobici come antibiotici [13] e disinfettanti [14].

Quando questi microrganismi sono potenzialmente patogeni o indesiderati, la formazione di biofilm e la loro presenza in esso è considerata un rischio e deve essere assolutamente evitata, specialmente in ambienti sensibili o nei locali d'allevamento destinati a fasi critiche (sale parto, svezzamenti, locali sovraffollati, ecc.). Chillaci e Vitale nella loro review del 2012 riportano che molti patogeni correlati alla salute animale, zoonosi e zoonosi alimentari trasmesse da Gram negativi come *Campylobacter spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram positivi come *Staphylococcus spp.* e *Listeria monocytogenes*, sono in grado di formare biofilm [15]. Biofilm indesiderati o patogenici possono rappresentare perciò delle problematiche, proprio per le loro caratteristiche di resistenza e disseminazione.

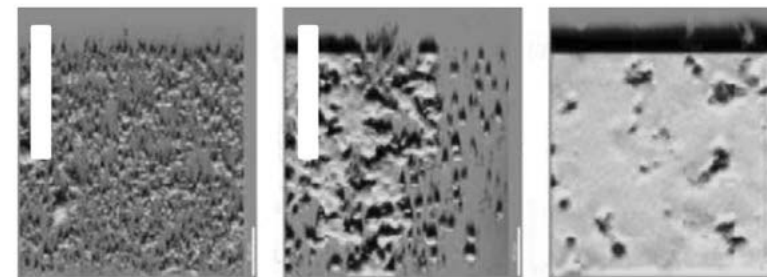
In suinicoltura è stato dimostrato che un'appropriata biosicurezza e una buona igiene possono significativamente migliorare i costi di produzione. Ad esempio, la differenza di redditività tra aziende ad elevata biosicurezza e quelle con bassa biosicurezza è stimato di circa 200€/scrofa/anno [16]. Infatti, la contaminazione dell'ambiente d'allevamento con potenziali batteri patogeni, aumenta il rischio di malattia. Per esempio, epidermiti causate da *Staphylococcus hyicus* o poliartriti da *Streptococcus suis* sono problematiche comunemente associate a situazioni di scarsa igiene in sala parto [17].

Biofilm positivo come soluzione innovativa per il miglioramento dell'ambiente in suinicoltura

Creare un biofilm positivo dopo la disinfezione e prima dell'inizio del ciclo successivo può essere considerato un approccio emergente preventivo per migliorare l'ambiente microbico nelle strutture d'allevamento. L'applicazione sulle superfici di allevamento, come pavimentazioni e strutture, di microrganismi benefici, possono prevenire o limitare lo sviluppo di biofilm indesiderati, risultando in un migliore equilibrio microbico dell'ambiente, con minori rischi di contaminazione degli animali. Il requisito fondamentale che deve avere questa tipologia di batteri, è un'elevata capacità colonizzativa. A tal proposito l'utilizzo di una specifica tecnologia, The BioFilm Ring Test sviluppata da BioFilm Control® [18,19], permette di selezionare batteri con la capacità di formare biofilm positivi in meno di 24h. Tale tecnologia ha permesso di selezionare una miscela concentrata di *Bacillus spp.* e batteri lattici, *Pediococcus spp.* La miscela è appunto caratterizzata da un'elevata capacità colonizzante come mostrato in Figura 3, attraverso l'osservazione e la validazione in real time del biofilm dei batteri selezionati grazie a microscopia confocale.

Figura 3: Sviluppo di biofilm positivo a: T0h, T6h, T24h - Fonte: MICALIS Institute – LALLEMAND

Figure 3: Positive biofilm development at : T0h, T6h, T24h - Source: MICALIS Institute – LALLEMAND



MATERIALI E METODI:

Il presente studio è stato effettuato al fine di valutare l'efficacia di una miscela di batteri vivi, nel controllo dello sviluppo e contaminazione del biofilm ambientale, in un contesto di campo, rappresentato da un allevamento suino. Per lo scopo è stata individuata una scrofaia a ciclo semichiuso di circa 250 scrofe situata nel cuore della Pianura Padana. All'interno della scrofaia sono state individuate due sale parto identiche, dalla superficie di 50 m² e 7 gabbie parto ciascuna. Una sala, denominata controllo, ha seguito la normale routine di pulizia e disinfezione. Nell'allevamento la routine di pulizia prevede, subito dopo lo svezzamento dei suinetti, il lavaggio con acqua pressurizzata e detergente, seguita da una prima disinfezione con soluzione acquosa di acido peracetico all'1%, il giorno successivo una seconda disinfezione con soluzione acquosa a base di quaternari d'ammonio e glutaraldeide al 2%. La seconda sala, denominata trattamento, dopo 4 ore dall'ultima disinfezione ha ricevuto una mistura a base di *Bacillus spp.* e *Pediococcus spp.* applicata su tutta la superficie e relative strutture fino ad un'altezza di 2 m dal suolo. Il prodotto è stato distribuito con normale pompa da spalla ad una dose di 0,1 g/m² di superficie nebulizzata. Le scrofe, lavate con acqua e detergente specifico, sono state introdotte nei locali dopo 3 giorni di vuoto sanitario come da normale protocollo aziendale.

Al fine di valutare eventuali effetti sulla formazione del biofilm ambientale è stata predisposta la raccolta di campioni, tramite tamponi ambientali, sulle superfici del pavimento grigliato e delle pareti divisorie in plastica tra una box parto e l'altro, per un totale di 40 tamponi, effettuati da un unico operatore. Ogni tampone, attraverso una specifica gestualità standardizzata, è stato applicato su una superficie casualmente scelta di 225 cm². I campioni sono stati prelevati in tre momenti diversi: poco prima dell'entrata delle scrofe in sala parto (T0), dopo 24 ore dall'entrata delle scrofe (T1) e a 4 giorni dall'entrata degli animali (T4). I tamponi sono poi stati direttamente consegnati ad un laboratorio accreditato, per la ricerca di: *Pediococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*

Per l'analisi statistica i dati sono stati comparati utilizzando il test non parametrico Mann-Withney. La significatività è stata dichiarata per valori di P inferiori a 0.05.

RISULTATI E DISCUSSIONI:

A livello generale, osservando la contaminazione iniziale a T0, ovvero appena prima

dell'entrata degli animali, non sono state osservate differenze significative, sia per tipologia di superficie analizzata sia tra le due sale parto. Da sottolineare invece come il protocollo aziendale di pulizia e disinfezione dei locali della sala parto sia da considerarsi opportuno e soddisfacente, almeno per le popolazioni microbiche osservate. In particolar modo infatti la presenza a T0 di E.coli e di streptococchi è risultata essere nulla, mentre era minima la presenza di enterobatteri e stafilococchi (Tab. 1). Situazione diversa invece per quanto riguarda la presenza di pediococchi.

		Controllo a T0	Trattamento a T0
		Log UFC/cm ²	Log UFC/cm ²
E.coli spp.	Pareti divisorie	0,0	0,0
	Pavimento grigliato	0,0	0,0
Enterobatteriacee spp.	Pareti divisorie	0,0	0,0
	Pavimento grigliato	0,0	0,8
Pediococcus spp.	Pareti divisorie	0,0	3,0
	Pavimento grigliato	0,0	4,6
Staphilococcus spp.	Pareti divisorie	0,8	1,1
	Pavimento grigliato	2,2	2,9
Streptococcus spp.	Pareti divisorie	0,0	0,0
	Pavimento grigliato	0,0	0,0

Tab. 1: Popolazione microbica media (Log/cm²) su Pavimento grigliato e Pareti divisorie prima dell'entrata degli animali in sala parto (T0).

Tab. 1: Average microbial population (Log/cm²) on Slatted Floor and Dividing Walls before animal entrance in farrowing room (T0).

Infatti, come mostrato nelle figure 4a e 4b, la presenza di pediococchi è stata rilevata solo nella stanza trattata per entrambe le superfici, con una contaminazione media di circa 4 Log UFC/cm² su pavimento grigliato e di circa 3 Log UFC/cm² su divisori in plastica. L'assenza di crescita di pediococchi nella stanza controllo per tutta la durata della prova indica che la colonizzazione è risultata efficace e l'applicazione del prodotto è risultata essere corretta. Inoltre la popolazione di pediococchi è risulta essere anche la più numerosa in assoluto, mentre gli stafilococchi sono risultati essere la seconda popolazione per numero e la principale per la sala controllo. In questo caso un'elevata presenza di flora positiva all'interno del biofilm ambientale, ha anche l'effetto di diluire eventuali batteri indesiderati eventualmente sfuggiti al processo di disinfezione.

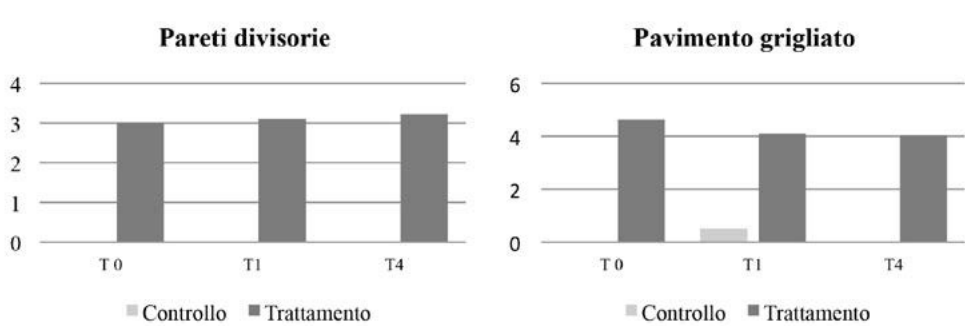


Fig. 4a e 4b: Conta di *Pediococcus* spp. (Log/cm²) su pareti divisorie e pavimento grigliato. La popolazione di pediococchi è risultata essere presente solo nella stanza trattata, e significativamente maggiore a T1 e T4 ($P < 0.05$). Ciò indica che il prodotto è stato efficace a creare un biofilm positivo anche in una situazione reale di allevamento.

Fig. 4a e 4b: *Pediococcus* spp. count (Log/cm²) on dividing walls and slatted floor. The population of *Pediococcus* was found to be present only in the treated room, and significantly higher at T1 and T4 ($P < 0.05$). This indicates that the product has been effective in creating a positive biofilm even in a real situation on farm.

Per quanto riguarda le superfici analizzate, il pavimento grigliato, a livello generale, è sembrato essere più contaminato rispetto alle pareti divisorie. Ciò può essere dovuto sia ad una maggior porosità dei materiali sia perché a diretta vicinanza e contatto con gli animali e le feci. Sempre per la superficie grigliata, osservando la tabella 2 è possibile notare come vi siano delle differenze significative tra la stanza controllo e quella trattata. Infatti in quest'ultima vi era una maggiore contaminazione positiva di *Pediococcus* spp. sia a T1 sia a T4 ($P < 0,05$), come già visto in precedenza, ma anche una contaminazione di streptococchi significativamente inferiore a T4 ($P < 0,05$) ed una forte tendenza ad una minor presenza di stafilococchi, sempre a T4 ($P = 0,057$). Inoltre per il gruppo controllo, su pavimento grigliato, vi è un aumento significativo per la popolazione di streptococchi tra T1 e T4 ed una forte tendenza ad una maggiore popolazione di stafilococchi ($P = 0,057$). Invece, osservando i risultati in tabella 3, risulta evidente come la carica batterica presente sulle pareti divisorie sia minima, ad eccezione dei pediococchi, significativamente maggiori per la stanza trattata. Per gli altri microrganismi ricercati le contaminazioni sono risultate essere minime e addirittura nulle per E.coli ed enterobatteri, e come conseguenza non vi sono state differenze significative tra le due stanze. Interessante però osservare che, per quanto riguarda gli stafilococchi, sembra esservi un effetto sulla velocità di crescita, come riportato in fig. 5: nella stanza trattata lo sviluppo all'interno del biofilm di questa popolazione appare più lento. A supporto di tale tesi sono però necessarie ulteriori indagini. Il fatto che non vi siano state differenze tra i due trattamenti sulle pareti divisorie è sicuramente riconducibile all'alto grado di pulizia dell'allevamento e al fatto che tali superfici non siano mai venute a contatto con gli animali durante l'arco della prova.

		Pavimento Grigliato		*P-value
		Controllo	Trattamento	
		Log UFC/cm ²	Log UFC/cm ²	
E.coli spp.	T1	0,0	0,4	n.s.
	T4	0,4	0,4	n.s.
Enterobacteriacee spp.	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,6	0,4	n.s.
Pediococcus spp.	T1	0,3	4,0	<0,05
	T4	0,0	3,9	<0,05
Staphilococcus spp.	T1	2,5	2,7	n.s.
	T4	3,6	3,0	0,057
Streptococcus spp.	T1	0,9a	1,3	n.s.
	T4	2,2b	1,7	<0,05

Tab. 2: Popolazione microbica media (Log/cm²) su Pavimento grigliato a 24 ore (T1) e a 4 giorni (T4) dopo l'entrata degli animali.

* Significatività per valori differenti sulla stessa riga

a,b diversi per P<0,05

Tab. 2: Average microbial population (Log / cm²) on Slatted floor at 24 hours (T1) and at 4 days (T4) after animals entrance.

* Significance for different values on the same row

a,b different for P <0,05

		Parete Divisoria		*P-value
		Controllo	Trattamento	
		Log UFC/cm ²	Log UFC/cm ²	
E.coli spp.	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,0	0,0	n.s.
Enterobacteriacee spp.	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,0	0,0	n.s.
Pediococcus spp.	T1	0,0	3,1	<0,05
	T4	0,0	3,1	<0,05
Staphilococcus spp.	T1	1,2	1,1	n.s.
	T4	1,5	1,5	n.s.
Streptococcus spp.	T1	0,0	0,6	n.s.
	T4	0,3	0,0	n.s.

Tab. 3: Popolazione microbica media (Log/cm²) su Parete divisoria a 24 ore (T1) e a 4 giorni (T4) dopo l'entrata degli animali.

* significatività per valori differenti sulla stessa riga

Tab. 3: Average microbial population (Log / cm²) on Dividing walls at 24 hours (T1) and at 4 days (T4) after animals entrance.

* Significance for different values on the same row

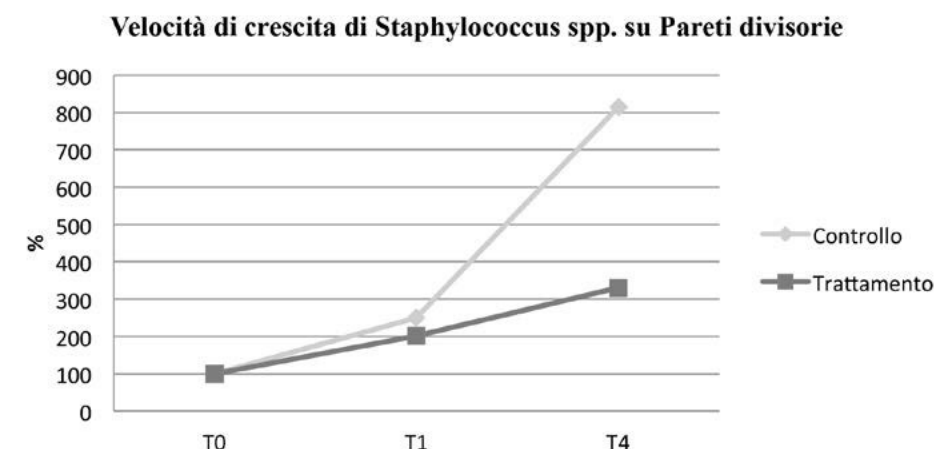


Fig. 5: Velocità di crescita di Staphylococcus spp. su Pareti divisorie a T0, T1 e T4, espressa in % rispetto alla popolazione iniziale (T0). Da notare come il profilo di crescita sia differente nel controllo dove la crescita è esponenziale mentre la stanza trattata ha un incremento lineare.

Fig. 5: Growth rate of Staphylococcus spp. on Dividing walls at T0, T1 and T4, expressed in % of the initial population (T0). It should be noted that the growth profile is different in the control where the growth is exponential while the treated room has a linear increase.

CONCLUSIONI:

L'utilizzo di una coltura microbica, complementare ad un corretto protocollo di pulizia e disinfezione sembra essere un valido strumento per aumentare il livello di biosicurezza dell'allevamento suino. E' infatti dimostrato che la coltura microbica limita la crescita di alcune popolazioni microbiche potenzialmente nocive e crea un biofilm con abbondante flora positiva in grado di diluire notevolmente eventuali microrganismi indesiderati ancora presenti dopo la disinfezione.

BIBLIOGRAFIA:

1. Maukonen J., Mättö J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. (2003), "Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review". J Ind Microbiol Biotechnol. 30, 327–356.
2. Briandet R., Fechner L., Naïtali M., Dreanno N. (2012), "Biofilms, quand les microbes s'organisent". France, QUAE, collection Carnet de sciences.
3. Richards J.J., Melander C. (2009), "Controlling bacterial biofilms". ChemBioChem. 10, 2287–2294.
4. Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007) "Biofilms and their relevance to veterinary medicine". Vet. Microbiol. 121, 1–2, 1–17.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999), "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". Science. 284, 1318–1322.
6. Tremblay Y., Hathroubi S., Mario J., (2014), "Bacterial biofilms: their importance in animal health and in public health". Can J Vet Res. 78, 110–116.
7. Karatan E., Watnick P. (2009), "Signals, regulatory networks, and materials that

- build and break bacterial biofilms". *Microbiol Mol Biol Rev.* 73, 310–347.
8. Sauer K. (2003), "The genomics and proteomics of biofilm formation". *Genom Biol.* 4, 219.
 9. Evans L.V. (2000), "Biofilms: recent advances in their study and control". Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
 10. Donlan R.M. (2001), "Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process". *Clin Infect Dis.* 33, 1387–1392.
 11. Ahmer B.M. (2004), "Cell-to cell signaling in *Eschericia coli* and *Salmonella enterica*". *Mol. Microbiol.* 52, 933–945.
 12. Miller M.B., Bassler B.L. (2001), "Quorum sensing in bacteria". *Annu Rev Microbiol.* 55, 165–99.
 13. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., Read, R. R. (2002), "Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics". *Can J Vet Res.* 66, 86–92.
 14. Sanchez-Vizuet P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briandet R. (2015), "Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms". *Front. Microbiol.* 6, 705.
 15. Chillaci D., Vitale M. (2012), "Biofilm Related to Animal Health, Zoonosis and Food Transmitted Diseases: Alternative Targets for Antimicrobial Strategy?" *J Microbial Biochem Technol.* 4, 7-10.
 16. Corregge I., Fourchon P., Le Brun T., Berthelot N. (2012), "Biosecurity and hygiene in pig farms: current status and impact on technical and economic performances". *Journées Recherche Porcine, France.* 44, 101-102.
 17. Cameron R.D.A. (2000), "A review of the industrialisation of pig production worldwide with particular reference to asia". *Animal Health and Area-wide Integration.*
 18. Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hebraud M., Bernardi T. (2007), "A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria". *J. Microbiol. Methods,* 68, 605-612.
 19. Azeredo J., Azevedo N.F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A.R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knøchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R.L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C. (2017), "Critical review on biofilm methods". *Crit Rev Microbiol.* 43, 313-351.

UTILIZZO DEI LAVAGGI BRONCO-ALVEOLARI PER LA DIAGNOSI DELLA MALATTIA RESPIRATORIA DEL SUINO E LA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA

USE OF BRONCHOALVEOLAR LAVAGE FOR THE DIAGNOSIS OF SWINE RESPIRATORY DISEASE AND ANTIBIOTIC CHOICE

GIACOMINI E.¹, LAZZARO M.¹, TONNI M.², LEOTTI G.³

¹ *Libero professionista – Brescia;* ² *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia;*

³ *Boehringer Ingelheim Italia AH - Milano*

Parole chiave: SRD, lavaggi broncoalveolari, antibiotici, suino

Key words: SRD, bronchoalveolar lavage, antibiotics, swine

Riassunto: Nell’ottica di una prudente utilizzazione degli antibiotici in corso di forme respiratorie, le tecniche diagnostiche che consentono di giungere, anche in animali vivi, all’isolamento dei batteri ed alla loro identificazione, assumono un ruolo importante nell’indirizzare la scelta del farmaco più appropriato per la terapia. Questo lavoro ha lo scopo di valutare l’efficacia del lavaggio broncoalveolare (BAL) nella diagnosi della malattia respiratoria del suino (SRD) e nel correlare i risultati ottenuti mediante questa tecnica, con la efficacia terapeutica della gamitromicina nei confronti di questa malattia. Sono stati eseguiti 400 BAL in dieci allevamenti, con un coinvolgimento complessivo di 200 suini. La terapia con gamitromicina è stata applicata alla metà dei suini coinvolti, mentre i suini non trattati hanno costituito il gruppo controllo. In 9 dei 10 allevamenti coinvolti, la tecnica BAL ha consentito di isolare almeno una specie batterica e il 17,25% dei fluidi ottenuti (BALF) sono risultati batteriologicamente positivi. I batteri maggiormente isolati da BALF sono stati: *Pasteurella multocida* e *Streptococcus suis*. I BALF hanno inoltre permesso di evidenziare in alcuni allevamenti, mediante tecniche biomolecolari, PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Dopo 24 ore dall’inizio della terapia, nel 70% dei suini trattati è stato registrato un miglioramento dello score clinico, con una differenza altamente significativa verso i controlli; inoltre in 8 dei 10 allevamenti coinvolti la percentuale dei suini nei quali si è registrato un miglioramento dello score clinico è stato superiore nei trattati verso i controlli ed in 5 di questi la differenza è risultata altamente significativa ($p < 0,01$).

Abstract: Diagnostic techniques play an important role in prudent use of antibiotics, helping to isolate and identify bacteria, also in live animals, and to guide the choice of the most appropriate drug for therapy. This study aimed the evaluation of the efficacy of bronchoalveolar lavage (BAL) in the diagnosis of swine respiratory disease (SRD) and its correlation with the therapeutic efficacy of gamithromycin. 400 BAL were performed in ten farms, in 200 pigs. The therapy with gamithromycin was applied to the half part of the pigs, the untreated pigs were the control group. In 9 farms the BAL technique allowed to isolate at least one bacteria and the 17,25% of the BAL fluids were bacteriologically positive. The most isolated bacteria were *Pasteurella multocida* and *Streptococcus suis*. A significant improvement of the clinical score was recorded in 70% of the treated pigs 24 hours after the beginning of the therapy. In 8 of 10 farms the percentage of pigs with an improvement of the clinical score was higher in the treated group and in 5 of these the difference was highly significant ($p < 0,01$).

INTRODUZIONE

Le recenti norme emanate dalle Autorità sanitarie sul corretto uso degli antibiotici in zootecnia (1) impongono un adeguamento delle tecniche diagnostiche atte a indirizzare con maggiore accuratezza le scelte terapeutiche. Le terapie adottate dovranno sempre più essere supportate dalle indicazioni fornite da specifici e aggiornati test di sensibilità e permettere, in condizioni di campo spesso complesse, la possibilità di adottare protocolli terapeutici completi e attuabili.

La tecnica per la diagnosi della *Swine Respiratory Disease* (SRD) utilizzata in questo lavoro, l'esame del lavaggio bronco-alveolare (BAL), è in grado di soddisfare le richieste delle Autorità sanitarie: consente l'isolamento di batteri in animali vivi e quindi la possibilità di aumentare il numero dei test di sensibilità effettuati, migliorando in questo modo le indicazioni fornite dal laboratorio diagnostico al veterinario aziendale nella scelta delle molecole più efficaci per la terapia (2).

La necessità di ridurre l'utilizzazione degli antibiotici in zootecnia porterà probabilmente a diminuire il numero e la durata dei trattamenti di massa per privilegiare terapie mirate (7). In questo lavoro si è sperimentata l'efficacia in campo verso SRD di un farmaco iniettabile che consente di facilitare la effettuazione di protocolli terapeutici completi verso questa malattia.

MATERIALI E METODI

Allevamenti e animali

Sono stati selezionati 10 allevamenti con episodi in corso di SRD, ma con suini non ancora trattati, almeno negli ultimi quindici giorni, con antibiotici, né per via orale né per via iniettiva. Tali allevamenti sono dislocati nella Regione Lombardia: sono esclusivamente allevamenti di svezzamento (siti 2), ingrasso (siti 3) o svezzamento-ingrasso (*weaning to finish*) con flussi gestiti in tutto-pieno/tutto-vuoto e con una capienza variabile da 2000 a 5000 capi presenti. Per ciascun allevamento sono stati arruolati 20 animali con un peso vivo compreso tra i 12 e 50 kg, tutti con sintomatologia clinica riconducibile a SRD (totale suini arruolati: 200). Gli animali sono stati successivamente assegnati in maniera casuale a due gruppi (A: trattati; B: non trattati – controllo).

Fluidi di lavaggio bronco-alveolare (BALF)

Ogni suino, preventivamente identificato singolarmente, è stato contenuto mediante l'utilizzo di torcinaso e morso apribocca per garantire l'apertura delle fauci. Una sonda monouso in plastica flessibile di 60 cm (PORTEX® Catheter, Smiths medical ASD, Inc.) è stata fatta scendere seguendo il profilo del palato duro e del palato molle, successivamente è stata fatta passare a livello del laringe nel momento di apertura dell'epiglottide per arrivare in trachea e fermarsi appena oltre la biforcazione bronchiale. La sonda è stata poi collegata ad una siringa sterile in plastica a cui è stato tolto l'ago ed è stato infuso un quantitativo pari a 10 ml di soluzione fisiologica all'interno dell'albero respiratorio. Dopo qualche secondo, il fluido del lavaggio (circa 3 ml) è stato delicatamente aspirato e inserito in una provetta sterile. I campioni così ottenuti sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione (4°C) e trasportati in laboratorio, entro poche ore, per essere immediatamente sottoposti all'analisi batteriologica ed eventualmente biomolecolare per i virus e Micoplasmi *spp*.

Score clinico

La gravità clinica è stata valutata secondo uno schema di classificazione precedentemente validato (3) e riportato in tabella 1. A ciascun soggetto è stato attribuito uno score (variabile da 0 a 3) in funzione delle condizioni del sensorio, dei sintomi respiratori, della tosse e della temperatura rettale.

Tabella 1. Parametri clinici utilizzati per classificare la gravità delle forme respiratorie (da: Roberts et al. 2011)

Table 1. Clinical parameter scoring system used to characterize respiratory disease in pigs (from: Roberts et al. 2011)

Score	Condizioni del sensorio	Sintomi respiratori	Tosse	Temperatura corporea
0 normale	Vigile, attivo, appetito normale, ben idratato, pelo normale	Frequenza e ritmo respiratorio nella norma, nessuna secrezione nasale anomala	Assente	Normale (<40°C)
1 lieve	Movimenti rallentati, pelo leggermente ruvido, può sembrare letargico ma dopo stimolazione reagisce normalmente	Frequenza respiratoria leggermente aumentata; leggero aumento della rumorosità della respirazione	Assente	Febbrile (≥40°C)
2 moderato	Non attivo, prevalentemente in decubito ma in grado di stare in piedi, magro, può essere disidratato	Aumento della frequenza respiratoria, alcune anomalie respiratorie	Occasionale	Febbrile (≥40°C)
3 grave	In decubito e riluttante ad alzarsi, magro, disidratato	Aumento della frequenza respiratoria con sforzi anormali - respirazione a bocca aperta, grugniti, postura a “cane seduto”	Ripetuta e marcata	Febbrile (≥40°C)

Diagnosi di laboratorio

Presso la sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) i BALF sono stati utilizzati per l'isolamento dei patogeni batterici e per la messa in evidenza di altri patogeni anche mediante tecniche biomolecolari. Sui batteri isolati si è proceduto alla valutazione della sensibilità agli antibiotici.

Protocollo sperimentale

In ognuno dei 10 allevamenti presi in esame sono stati individuati due gruppi (A e B) clinicamente omogenei di animali, costituito ognuno da 10 soggetti, individuati singolarmente (totale animali arruolati per ogni allevamento: 20).

Al giorno “0” della sperimentazione (T0) gli animali dei due gruppi sono stati valutati clinicamente secondo lo schema riportato in tabella 1; è stato inoltre effettuato il prelievo dei BALF.

Sempre a T0, gli animali del gruppo A sono stati trattati con gamitromicina (Zactran®, Boehringer Ingheleim Italia AH, Milano) iniettabile (dose: 1 ml ogni 25 Kg di PV per via IM, pari a 6 mg di p.a. per Kg di PV, con unico intervento). Gli animali del gruppo B non sono stati sottoposti a terapia (gruppo di controllo).

Il giorno successivo (giorno 1 della sperimentazione, T1), è stato ripetuto l'esame clinico, con relativa attribuzione del nuovo score clinico ed il prelievo dei BALF, di tutti i soggetti.

Analisi statistica

Preliminarmente, sono state valutate eventuali differenze statisticamente significative in termini di gravità della sintomatologia (score) al giorno T0 della sperimentazione. Successivamente è stata valutata la variazione dello score clinico dei due gruppi di prova, sia considerando il complesso dei soggetti, sia esaminando singolarmente le aziende.

A tale scopo, le condizioni cliniche sono state considerate come:

- “migliorate” se gli animali, a 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), presentavano un valore di score clinico inferiore rispetto a quello osservato a T0;
- “stabili o peggiorate” se gli animali, a 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), presentavano un valore di score clinico uguale o superiore rispetto a quello osservato a T0.

I dati quantitativi sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney, mentre per i dati qualitativi è stato utilizzato il test chi-quadrato. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS ver. 23.

RISULTATI

In 9 dei 10 allevamenti coinvolti, l’esame batteriologico dei BALF ha consentito l’isolamento di almeno una specie batterica e il 17,25% dei 400 fluidi estratti è risultato batteriologicamente positivo. La suddivisione per specie dei 76 batteri isolati dai BALF è stata , in ordine decrescente di frequenza di isolamento, la seguente: *Streptococcus suis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus parasuis*, *Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*. L’esame dei BALF mediante tecniche biomolecolari ha inoltre permesso di evidenziare, in alcuni allevamenti, PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

L’inoculazione del farmaco utilizzato non ha indotto nessuna reazione locale o generale degna di nota.

La condizione clinica dei soggetti dei due gruppi ad inizio sperimentazione (T0) è riportata in figura 1. La media dello score clinico è risultata di 2,01 e 2,02 rispettivamente nei soggetti del gruppo A e del gruppo B. Nessuna differenza statisticamente significativa ($p>0,05$) è stata osservata per quanto riguarda sia la proporzione di soggetti entro le tre classi di gravità, sia per quanto riguarda il valore medio dello score clinico.

A 24 ore dall’inizio della sperimentazione (T1), tra i soggetti dei due gruppi è stata osservata una differenza altamente significativa ($p<0,01$) della proporzione di soggetti che presentavano un miglioramento delle condizioni cliniche: il 70% dei soggetti trattati (gruppo A) presentavano a T1 una riduzione dello score clinico; nel gruppo B il miglioramento era evidente solo nel 31% degli animali (figura 2).

La figura 3 riporta la variazione della condizione clinica degli animali dei due gruppi osservata a T1 per ciascuna delle 10 aziende coinvolte nella sperimentazione. Tranne che nelle aziende 1 e 2, nelle quali non sono state osservate differenze tra i due gruppi di animali, negli altri 8 allevamenti la percentuale di animali in cui le condizioni cliniche sono migliorate è costantemente più elevata nel gruppo A (trattato). In 5 delle 10 aziende coinvolte (azienda 4, 6, 7, 8, 9) tale differenza è risultata altamente significativa ($p<0,01$).

Figura 1. Inizio sperimentazione (T0). Percentuale di soggetti nelle tre classi di score clinico (tutti gli allevamenti).

Figure 1. Beginning of experimentation (T0). Percentage of subjects in the three classes of clinical score (all farms).

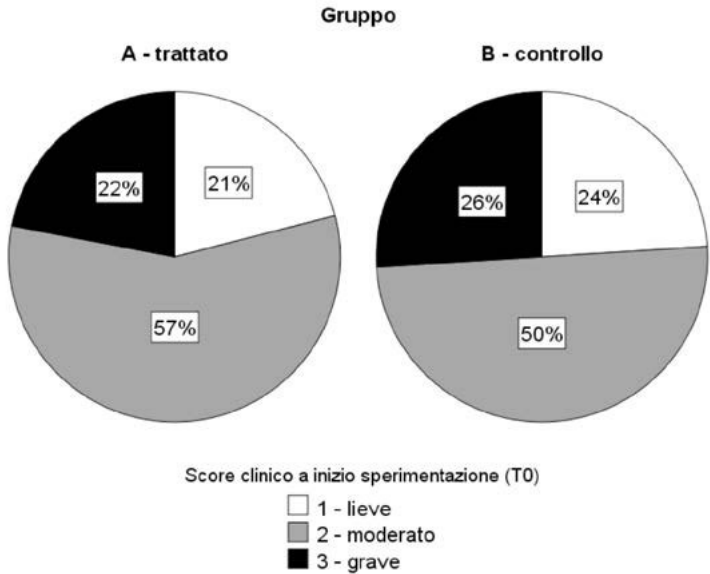


Figura 2. Fine sperimentazione (T1). Variazione delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi (tutti gli allevamenti).

Figure 2. End of experimentation (T1). Variation of the clinical conditions of the animals in the two groups (all farms).

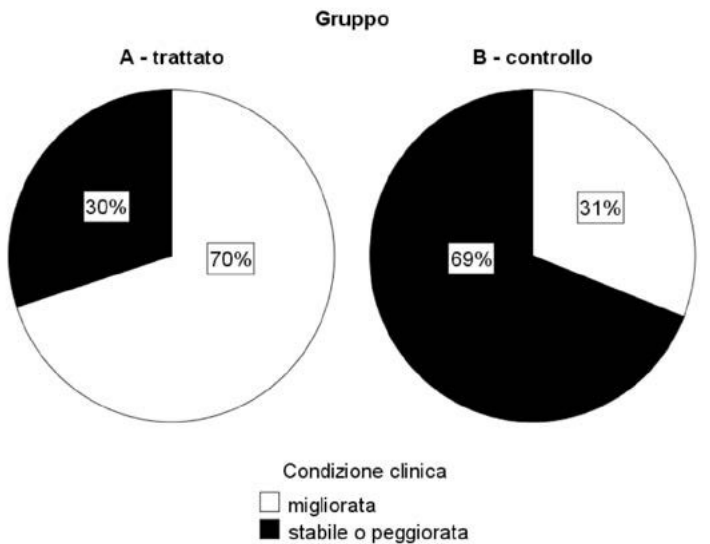
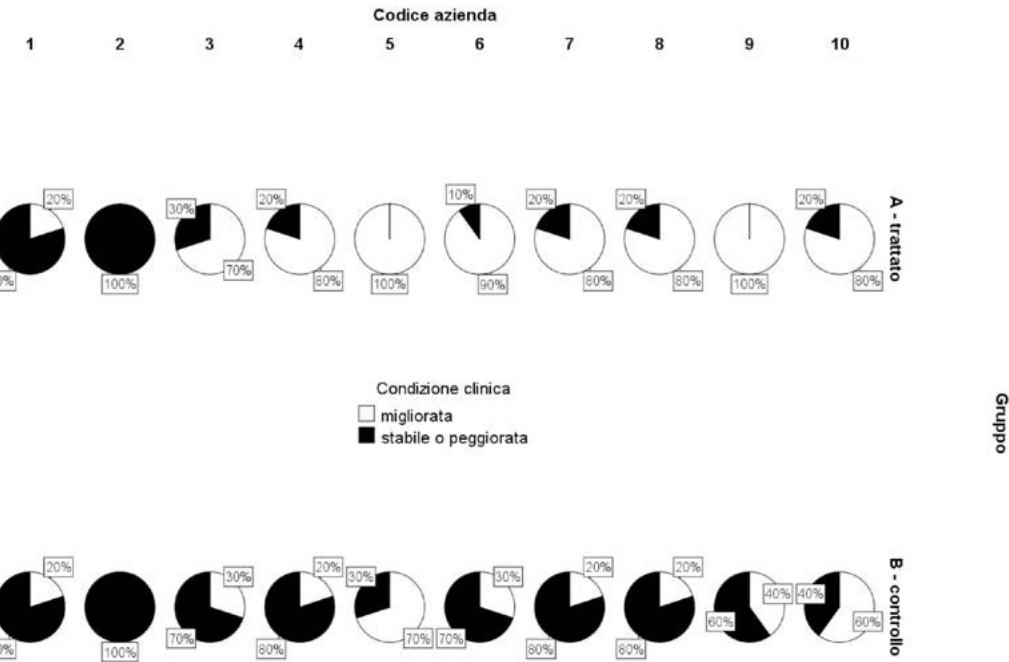


Figura 3. Fine sperimentazione (T1). Variazione delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi per ciascuna delle 10 aziende.

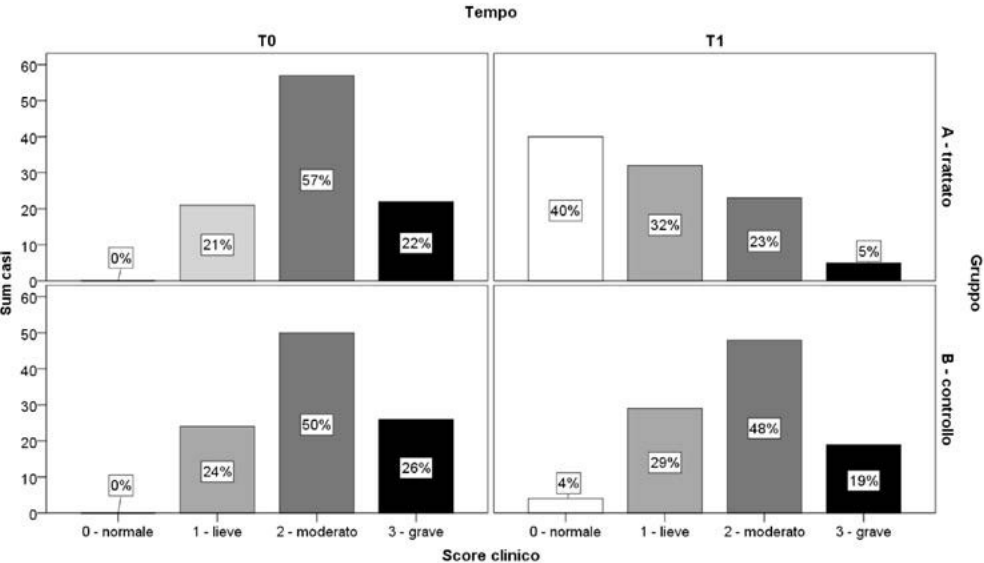
Figure 3. End of experimentation (T1). Variation of the clinical conditions of the animals in the two groups for each of the 10 farms.



La figura 4 riporta la distribuzione dei valori di score clinico nei due gruppi di animali (A e B) all’inizio della sperimentazione (T0) e 24 ore più tardi (T1). Solo il 28% dei suini trattati presentano in T1 sintomi clinici moderati o gravi (score 2 e 3) contro il 67% dei controlli.

Figura 4. Distribuzione di frequenza delle condizioni cliniche degli animali dei due gruppi a T0 (sinistra) e a T1 (destra).

Figure 4. Frequency distribution of the clinical conditions of the animals of the two groups at T0 (left) and at T1 (right).



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I 76 isolamenti batterici eseguiti a partire dai 400 fluidi di lavaggio bronco-alveolare (BALF) inviati al laboratorio, dimostrano l’efficacia di questa tecnica di prelievo del materiale diagnostico per quanto riguarda le possibilità di individuare i batteri agenti eziologici di SRD. Il BALF si è dimostrato inoltre utilizzabile in numerose condizioni di campo. Come già riportato in letteratura (2), l’esame dei BALF mediante tecniche biomolecolari, ha inoltre consentito di individuare altri agenti eziologici importanti di SRD, come PRRSV e *Mycoplasma hyopneumoniae*. Tuttavia, in nessuno dei 400 BALF esaminati è stato possibile isolare *Actinobacillus pleuropneumoniae*, nemmeno dai campioni provenienti da aziende con anamnesi storica positiva per questo agente eziologico (isolato anche recentemente in queste stesse aziende a partire da tamponi tracheo-bronchiali -risultati non riportati); questo dato conferma l’osservazione già riportata da altri Autori (2) della apparente difficoltà di isolamento di *Actinobacillus pleuropneumoniae* a partire dai BALF.

Le due specie batteriche di più frequente isolamento dai BALF in questo lavoro, *Pasterurella multocida* e *Streptococcus suis*, sono le stesse che risultarono le più isolate in una ampia indagine batteriologica condotta su polmoni di suino con problematiche sanitarie in Italia (4). Relativamente a *Streptococcus suis*, la sua responsabilità nelle forme respiratorie del suino è notoriamente controversa e sembra comunque partecipare esclusivamente come germe di irruzione secondaria su altre infezioni batteriche più propriamente polmonari (5). Il farmaco utilizzato non ha tra le sue indicazioni tale batterio e la sua attività nei confronti di questo germe non è conosciuta.

Per quanto riguarda invece *Haemophilus parasuis*, da tempo identificato come un potenziale agente eziologico di SRD (6) e isolato da suini, in certe realtà, con una frequenza elevata (2), in questo lavoro è stato isolato unicamente in 5 BALF provenienti dallo stesso allevamento (dato non riportato). Tuttavia, è nota e condivisa dai responsabili dei laboratori diagnostici nazionali, la difficoltà di isolamento di questo microrganismo nella diagnostica routinaria. La efficacia clinica del farmaco impiegato, che ha una attività esclusivamente antibatterica, utilizzato nel corso dei 10 focolai di SRD presi in esame, è evidenziata con chiarezza dai risultati riportati nel presente lavoro che confermano quelli precedentemente ottenuti nel nostro paese con lo stesso farmaco (7).

Tale efficacia clinica va valutata anche alla luce di alcune considerazioni: a) gli agenti eziologici di SRD possono essere anche virali e questo potrebbe giustificare il fallimento della terapia antibiotica osservata in due aziende; b) la valutazione dell'efficacia clinica è stata eseguita a sole 24 ore dalla terapia, ma l'efficacia terapeutica della stessa si prolunga, per questo antibiotico, per almeno 6 giorni e fino a 10 in relazione ai batteri presenti nel suino trattato; c) in 8 focolai di SRD sui 10 presi in esame è stato osservato un maggior numero di suini con miglioramento dello score clinico nel gruppo dei trattati; in 5 di queste 8 aziende è stata osservata una differenza altamente significativa; d) in uno dei due focolai di SRD dove lo score clinico medio ed il numero di suini con miglioramento dello stesso non è variato da T0 a T1 per nessuno dei 20 suini presi in esame, sono stati isolati, da solo due dei 40 BALF inviati al laboratorio diagnostico, *Streptococcus suis* e *Trueperella pyogenes* (microrganismo quest'ultimo non considerato comunemente come potenziale agente eziologico di SRD (6)-dati non riportati): in tale azienda è stata evidenziata, con i test biomolecolari, la presenza di PRRSV in tutti i pool di BALF e sieri prelevati dai suini presi in considerazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Ministero della Salute (2012). Manuale di biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia, http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.pdf.
2. Palzer A, Ritzmann M, Wolf G, Heinritzi K. (2008). Association between pathogens in healthy pigs and pigs with pneumonia, Vet. Record, 162, 267-272.
3. Roberts E., Hammer J.M., Lechtenberg K., Roycroft, L., King S. (2011). Investigation of tiamulin hydrogen fumarate in-feed antibiotic for the control of porcine respiratory disease complex that includes *Mycoplasma hyopneumoniae*", J. Swine Health Prod., 19, 218-225.
4. Sarli G., Ostanello F., Morandi F., Fusaro L., Gnudi M., Bacci B., Nigrelli A., Alborali L., Dottori M., Vezzoli F., Barigazzi G., Fiorentini L., Sala V., Leotti G., Joisel F. (2009). Application of a protocol for the diagnosis of postweaning multisystemic wasting syndrome in Italy. Vet. Record, 164, 519-23.
5. Sala V. (2013). Streptococcosi. In: a cura di P. Martelli "Le patologie del maiale", PVI editore, cap.37, 551-562.
6. Opriessnig T., Giménez-Lirola L.G., Halbur P.G. (2011). Polymicrobial respiratory diseases in pigs. Animal Health Research review, 12,133-148.
7. Scollo A., Mazzoni C., Gottardo F. (2017). An alternative approach to reduce systematic oral mass antimicrobial use in pigs for a prudent use of antibiotics. In Proceedings of the 9th European Symposium Porcine Health Management, 3-5 May 2017, Poster session HME-053, 310.

EPIDEMIOLOGIA DI PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 IN NORD ITALIA

EPIDEMIOLOGY OF PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3 IN NORTHERN ITALY

LEGNARDI, M.¹, FRANZO, G.¹, CECCHINATO, M.¹, TUCCIARONE, C.M.¹,
SANDRI, G.P.², DRIGO, M.¹

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) - Università di Padova;

²Agricola Tre Valli, Gruppo Veronesi.

Parole chiave: Porcine circovirus type 3; direct PCR; epidemiologia.

Key words: Porcine circovirus type 3; direct PCR; epidemiology.

Riassunto: La recente scoperta di *Porcine circovirus type 3* (PCV3) ha ravvivato l'interesse nei confronti dei membri del genere *Circovirus* nell'ambito della suinicoltura. Il suo riscontro in diverse regioni del mondo in animali afflitti da diverse condizioni cliniche ha generato una certa preoccupazione, sebbene il reale nesso causale non sia stato dimostrato. Nel presente studio sono state valutate, tramite l'applicazione di metodiche di biologia molecolare, la presenza e la diffusione di PCV3 nel nord Italia. La conoscenza di dati anamnestici, clinici e anatomopatologici, unita all'esecuzione di prove diagnostiche collaterali, ha permesso di valutare l'associazione fra l'infezione e la presenza di sindromi cliniche nonché la presenza di coinfezioni con altri patogeni. Complessivamente, è stato possibile dimostrare la rilevante presenza di PCV3 in Italia (30% dei campioni e 47,2% degli allevamenti testati). Il virus è stato inoltre rilevato in diverse matrici, inclusi il tessuto polmonare (17/39, 43,65%), pool di organi (10/29, 34,5%), sieri (6/33, 18,2%), fluido orale (2/8, 25%) e tamponi nasali (1/3, 33,3%). Tali evidenze lasciano intuire una distribuzione sistemica di PCV3, con una possibile predilezione per il polmone. Al contrario di quanto riportato da altri studi, il virus non è stato ritrovato in tessuti del tratto riproduttivo né in casi di aborto. Inoltre, non sono state riscontrate chiare associazioni con determinate sindromi cliniche né con altri patogeni. Sebbene la natura del campionamento impedisca di trarre delle conclusioni definitive, i risultati di questo progetto suggeriscono una certa cautela nell'inferire il ruolo patogenetico di PCV3 e impongono l'esecuzione di ulteriori studi per confermare o confutare questa ipotesi.

Abstract: The recent discovery of *Porcine circovirus type 3* (PCV3) has renewed the interest towards species belonging to the *Circovirus* genus and affecting the swine. PCV3 has been found in different parts of the world and has been linked to several clinical conditions, although its exact pathogenetic role has yet to be determined. In the present study, PCV3 presence and spread in Northern Italy have been evaluated by molecular biology assays. The knowledge of anamnestic, clinical and anatomopathological data, along with other diagnostic investigations, has allowed to evaluate the link between PCV3 infection and the presence of symptoms, and to highlight coinfections occurrence.

Shortly, it was demonstrated that PCV3 is largely circulating in Italy (30% of samples, as well as 47,2% of sampled farms, tested positive for this virus). PCV3 was detected in different matrices, such as lung tissue (17/39, 43,65%), pools of various organs (10/29, 34,5%), sera (6/33, 18,2%), oral fluids (2/8, 25%) and nasal swabs (1/3, 33,3%). These findings lead to suppose that PCV3 is characterized by a systemic distribution, with the

possibility of a preferential respiratory tropism. Contrary to what has been reported by other studies, PCV3 has not been found in reproductive system tissue nor in case of abortion. Furthermore, no meaningful association has been proven between PCV3 detection and the presence of clinical symptoms nor infection with other pathogens.

Despite the sampling nature has prevented from drawing definite conclusions, the results of this work suggest to proceed cautiously when inferring the pathogenetic role of PCV3 and highlight the necessity of further studies to confirm or reject this hypothesis.

INTRODUZIONE

La recente scoperta di *Porcine circovirus type 3* (PCV3), avvenuta per mezzo di analisi metagenomiche (Palinski et al., 2017), ha alimentato alcune preoccupazioni fra i veterinari di campo e attirato l'attenzione della comunità scientifica. Si tratta della terza specie appartenente al genere *Circovirus* in grado di infettare il suino dopo *Porcine circovirus type 1* (PCV1) e *Porcine circovirus type 2* (PCV2). Mentre l'importanza dell'apato geno PCV1 è marginale (Tombácz et al., 2014) a partire dagli anni '90 PCV2 è emerso come uno dei principali patogeni ad affliggere la produzione suinicola mondiale, causa di ingentissime perdite economiche dovute ad un complesso di malattie descritte collettivamente come *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD) (Alarcon et al., 2013). Per quanto riguarda PCV3, le conoscenze sulla sua epidemiologia sono ancora limitate. Descritto sinora in Cina (Ku et al., 2017) Stati Uniti (Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016) Corea (Kwon et al., 2017) e Polonia (Stadejek et al., 2017) questo virus è già stato associato a diverse manifestazioni cliniche tra cui disordini riproduttivi, miocarditi, infiammazioni multisistemiche, sindromi dermatite-nefrite e respiratorie, anche se non ne è ancora stato chiarito l'esatto ruolo patogenetico, sia esso presente da solo o in coinfezione (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Shen et al., 2017). Per questi motivi, e *in primis* per via dei molti punti di contatto con il ben più noto PCV2, l'importanza epidemiologica di PCV3 è potenzialmente notevole ma ancora tutta da provare.

In questo progetto si è ricercato PCV3 in campioni provenienti dalla routinaria attività diagnostica condotta da un'importante filiera produttiva del Nord Italia, con l'obiettivo di indagarne la presenza sul territorio, il possibile ruolo epidemiologico e i materiali biologici in cui è possibile ritrovarlo.

MATERIALI E METODI

Al fine di studiare l'epidemiologia di PCV3 sono stati selezionati 120 campioni, tutti precedentemente risultati positivi per altri patogeni (respiratori e non). I campioni, conservati a -80°C, risultavano prelevati tra il 2014 e il 2017 tra Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Piemonte e Friuli-Venezia Giulia, in 55 allevamenti appartenenti a diverse fasi di una filiera multisito, ed erano quindi rappresentativi di diverse categorie produttive.

Brevemente, i campioni inclusi nello studio comprendevano: tessuto polmonare, placentare e fetale (in caso di episodi di aborto), *pool* di diversi organi, sangue, fluidi orali, tamponi nasali, raschiati orofaringei e spugnette (utilizzate per il campionamento delle superfici degli automezzi per il trasporto animali).

I campioni si dividevano tra quelli prelevati nell'ambito della regolare attività di autocontrollo, per i quali non erano disponibili dati anamnestici precisi, e altri prelevati in presenza di un sospetto clinico.

Per ciascun campione sono state raccolte, quando disponibili, le seguenti informazioni:

- Anno di campionamento;
- Esito della PCR per la ricerca di PCV3;
- Matrice del campione;

- Posizione dell'allevamento campionato;
- Categoria produttiva ed età dell'animale;
- Motivo del prelievo;
- Presenza o meno di sintomatologia;
- Presenza o meno di reperti necroscopici;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV), PCV2, *Swine influenza virus* (SIV), *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), *Mycoplasma hyorhinis* (Mhr), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Corinebacterium pyogenes*, *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) e *Bordetella bronchiseptica*;

Tutti i campioni sono stati successivamente testati per il rilevamento dell'infezione da PCV3, utilizzando una metodica di *direct PCR* precedentemente validata (Franzo et al., 2018).

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha previsto l'impiego dei software *R* (*R Core Team, 2016*) e *Microsoft® Excel®*, fissando il livello di significatività a $p < 0,05$.

RISULTATI

Le indagini diagnostiche hanno permesso di ricavare una buona quantità di informazioni sull'epidemiologia di PCV3, molte delle quali inedite.

Tra i 120 campioni analizzati, 36 (30%) sono risultati positivi per PCV3, dimostrando la presenza di questo virus in 26 dei 55 (47,2%) allevamenti testati (Figura 1).



Figura 1. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di PCV3.

Figure 1. Geographic distribution of PCV3 positivities.

La distribuzione delle positività per PCV3 nelle diverse categorie produttive è illustrata in Figura 2.

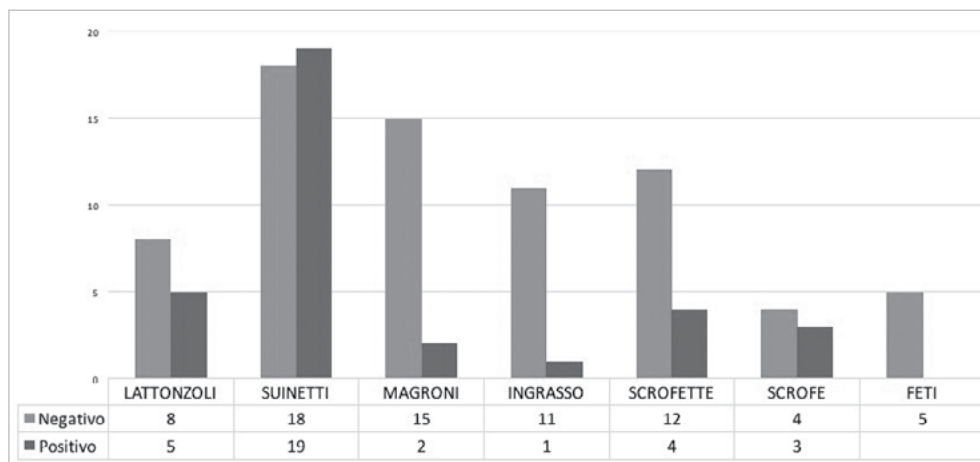


Figura 2. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di PCV3 divisi per categoria produttiva.

Figure 2. PCV3 test results count classified according to the different productive categories.

PCV3 è stato ritrovato in tessuto polmonare (17/39, 43,65%), pool di organi (10/29, 34,5%), sieri (6/33, 18,2%), fluido orale (2/8, 25%) e tamponi nasali (1/3, 33,3%); le 4 spugnette, l'unica placenta e il singolo raschiato orofaringeo testati si sono rivelati tutti negativi.

PCV3 è stato riscontrato in coinfezione con PRRSV, PCV2, SIV, *Streptococcus suis*, Mhyo, Mhr, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Corinebacterium pyogenes* (Figura 3). In nessuno dei campioni positivi per PCV3 erano stati ricercati PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

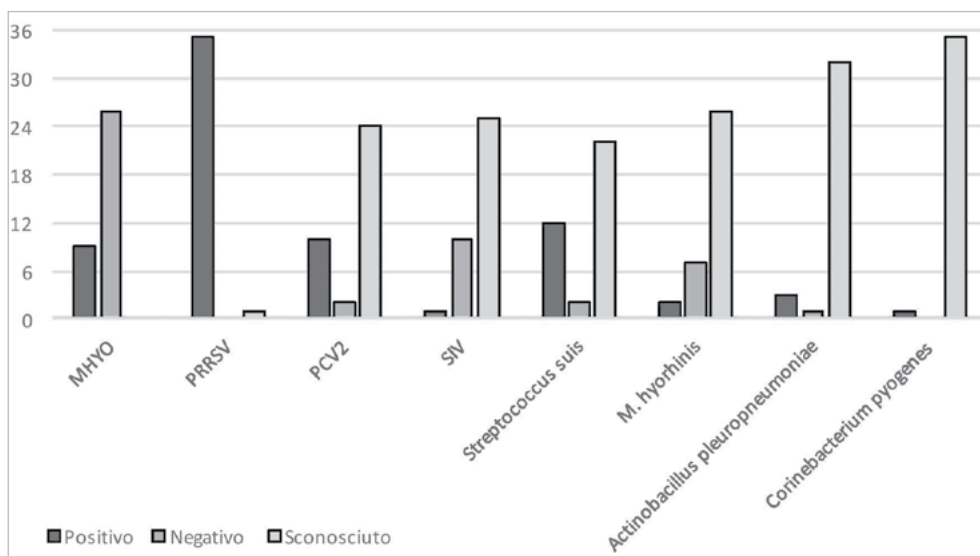


Figura 3. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di PCV3.

Figure 3. Count of test results for different pathogens in PCV3-positive samples.

PCV3 è stato ritrovato in presenza di sintomi respiratori (12/28, 42,8%) e sistemici (3/14, 21,4%), ma non riproduttivi (0/7, 0%), mentre le altre 21 positività sono state attestate in assenza di segni clinici.

In 18 dei 43 casi in cui era segnalata la presenza di lesioni broncopolmonari è stato possibile dimostrare la presenza di PCV3.

DISCUSSIONE

La recente scoperta di PCV3 e la sua identificazione in diversi stati rappresentano sicuramente una rilevante novità nel panorama della suinicoltura. Il ritrovamento di questo virus in animali affetti da sintomatologia e lesioni di vario tipo, seppur non sufficiente a dimostrarne il reale ruolo patogenetico, lo configura come una potenziale minaccia, e, conseguentemente, come un necessario target di approfonditi studi epidemiologici.

Le positività riscontrate nel presente studio non si sono limitate ad un rinvenimento sporadico, ma evidenziano come PCV3 sia ampiamente diffuso nonostante la recentissima scoperta. Sebbene non sia possibile inferire la prevalenza per via della natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza, PCV3 è stato ritrovato nel 30% dei campioni: un dato sorprendente, il quale non fa che corroborare l'ipotesi che questo microrganismo sia epidemiologicamente affine a PCV2, patogeno ubiquitario e nella maggior parte dei casi non associato a sintomatologia clinica (Alarcon et al., 2013).

La distribuzione di PCV3 nelle diverse fasce d'età e nei diversi siti produttivi non risulta trattata negli studi svolti finora su questo microrganismo. I dati raccolti nell'ambito di questo progetto mostrano un picco statisticamente significativo (con un 51% di positività) in corrispondenza del periodo tra la quinta e l'ottava settimana di vita: ciò è probabilmente collegato al rimescolamento e allo stress a cui sono sottoposti i suinetti al momento dello svezzamento, un momento particolarmente critico in termini di pressione infettante e di capacità di risposta dell'animale. Il limitato numero di soggetti infetti durante le primissime settimane di vita e la progressiva decrescita dell'incidenza fino all'8% riscontrato in fase di ingrasso rende plausibile ipotizzare che gli animali acquisiscano, passivamente o attivamente, un'immunità in grado di contrastare efficacemente l'infezione; non è inoltre da escludere che l'organizzazione tipicamente multisito della filiera da cui provenivano i campioni contribuisca a combattere la trasmissione orizzontale. Il fatto che sia nelle scrofe sia nei lattonzoli si sia rinvenuto PCV3 porta a speculare sulla possibilità di una qualche forma di trasmissione verticale, sebbene il mancato rilevamento del virus in tessuti fetali non permetta di stabilire se questa trasmissione avvenga a livello intrauterino, come suggerito da precedenti studi che hanno evidenziato PCV3 in presenza di turbe riproduttive (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS, o se invece interessi il periparto. Le informazioni raccolte delineano un quadro epidemiologico che ancora una volta presenta punti di contatto con PCV2.

Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative fra diverse matrici per quanto concerne il ritrovamento di PCV3. Tuttavia, è stato possibile osservare un eccesso di positivi rispetto alle frequenze attese relativamente al tessuto polmonare. Sebbene il semplice riscontro di positività in PCR non permetta di definire con precisione il reale tropismo del virus, i dati ottenuti lasciano intuire una distribuzione sistemica del virus, con una potenziale predilezione per il polmone. Mentre il rilevamento di PCV3 tramite PCR a partire da siero, polmone e altri organi è già stato riportato (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) la possibilità di amplificarne il DNA a partire da fluidi orali e tamponi nasali rappresenta un dato inedito. È inoltre interessante notare come le PCR condotte a partire da campioni di materiale fetale o sangue materno collegati ad episodi di aborto non abbiano

evidenziato in nessuno dei 7 casi la presenza di PCV3, a differenza di quanto riportato da altri autori (Palinski et al., 2017). La natura del campionamento si è rivelata un ostacolo nell'elaborazione dei dati relativi alle coinfezioni. Tutti i campioni erano infatti positivi almeno a uno tra PRRSV e PCV2, e l'intensità con cui i vari patogeni erano stati ricercati risultava estremamente variabile. Nella maggior parte dei casi ci si è quindi dovuti limitare a statistiche puramente descrittive. Attualmente non è disponibile alcun dato inerente alle interazioni tra PCV3 e altri patogeni, quindi tutte le informazioni ottenute in merito alle coinfezioni sono da considerarsi inedite. La frequenza di rinvenimento di PCV3 nei campioni positivi per PRRSV si è rivelata maggiore rispetto alle attese, tanto da essere statisticamente significativa (Figura 4). Tuttavia, per quanto sopra menzionato, l'accertamento del significato eziopatogenetico di questa associazione necessita di ulteriori studi sperimentali.

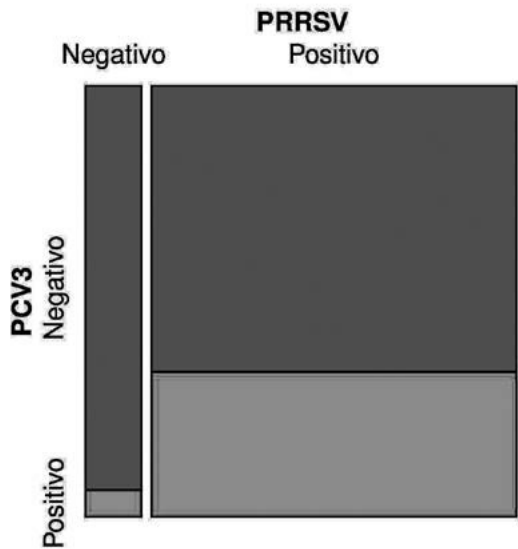


Figura 4. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 e PRRSV.
Figure 4. Mosaic plot that shows the relationship between PRRSV and PCV3 test results.

Il ritrovamento di PCV3 è stato più frequente rispetto alle attese in campioni negativi per PCV2, ma ancora una volta si tratta di una differenza non statisticamente significativa. Per quanto suggestiva, l'eventualità che esista una competizione di qualche tipo tra PCV3 e PCV2 è ancora tutta da provare. La frequenza con cui PCV3 è stato rinvenuto risulta maggiore rispetto alle attese in campioni prelevati in soggetti sintomatologici e in reperti necroscopici patologici. Queste differenze non si sono tuttavia rivelate significative dal punto di vista statistico e, alla luce della natura del campionamento, non è possibile affermare che siano dovute a fondate ragioni eziopatogenetiche; più facile è supporre che le differenze osservate siano dovute almeno in parte all'effetto confondente della matrice, dato che spesso alla presenza di sintomi e lesioni respiratorie corrispondevano campioni prelevati a livello polmonare, in cui PCV3 è stato ritrovato più frequentemente rispetto ad altre matrici.

Parallelamente allo svolgimento dei saggi di PCR, si è deciso di sequenziare il genoma completo di PCV3 a partire da uno dei campioni risultati positivi. Ciò è stato fatto con una doppia finalità: da una parte confermare la specificità del metodo, dall'altra ricavare la sequenza di un isolato di PCV3 circolante sul suolo italiano. La sequenza ottenuta, seppur chiaramente interna allo stesso *clade* raggruppante gli altri genomi conosciuti di PCV3 (Figura 5), risulta diversa da quelle attualmente note. Particolarmente importante è la distanza genetica dalla sequenza 29160, dalla quale è stato ricavato il controllo positivo utilizzato in questo lavoro, attestante l'assenza di false positività dovute a cross-contaminazioni. L'evidente diversità genomica tra i diversi isolati, unitamente ad una circolazione attestata in diversi contesti geografici, supporta l'ipotesi che le radici della storia evolutiva di PCV3 antecedano grandemente la sua scoperta, contribuendo ad accomunare una volta di più questo virus emergente con PCV2.

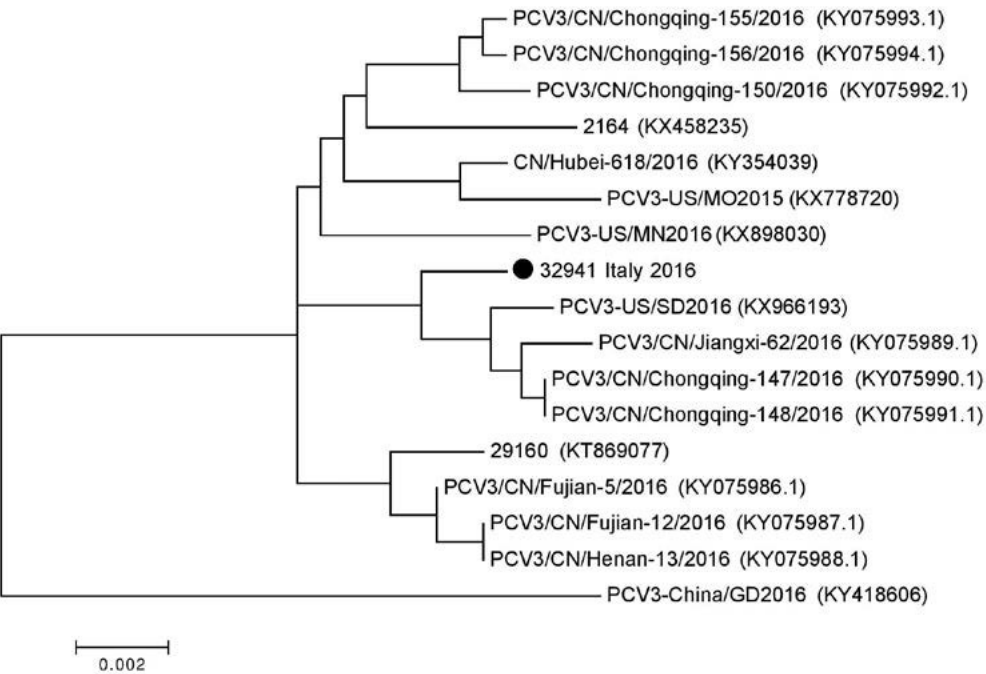


Figura 5. Albero filogenetico raggruppante tutte le sequenze di PCV3 conosciute. La sequenza evidenziata (cerchio nero) è stata ottenuta a partire dal campione 32941. L'albero è stato costruito con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016) applicando il metodo di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei, a sequenze precedentemente allineate con il metodo *MUSCLE*.
Figure 5. Phylogenetic tree including all available PCV3 sequences. The highlighted sequence (full circle) has been obtained by sequencing sample 32941. The tree was built with MEGA7 software (Kumar et al., 2016), by applying the *Maximum Likelihood* approach based on Tamura-Nei model on sequences that were aligned with *MUSCLE*.

CONCLUSIONI

L'applicazione di metodiche di biologia molecolare precedentemente validate ha permesso una significativa, seppur preliminare, analisi dell'epidemiologia di PCV3 nel Nord Italia, la quale si aggiunge al numero in rapida crescita di segnalazioni provenienti da varie parti del mondo (Kwon et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Stadejek et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS).

Le numerose positività riscontrate ne hanno dimostrato l'ampia circolazione nel territorio, la quale rappresenta solo uno dei molti aspetti in comune tra la sua epidemiologia e quella dell'ubiquitario PCV2.

Tra le altre informazioni ricavate si annoverano la presenza di un picco di frequenze di PCV3 in soggetti dall'età compresa tra le 5 e le 8 settimane, il rinvenimento a partire da matrici mai testate sinora e la presenza in coinfezione con vari patogeni sia virali che batterici; è stata inoltre attestata un'associazione statisticamente significativa tra le positività per PCV3 e quelle per PRRSV. Per una piena comprensione del significato di questi risultati, e quindi della reale importanza eziopatogenetica di PCV3, saranno ovviamente necessari ulteriori studi sperimentali, scevri dalle limitazioni che hanno connotato questo progetto, legate essenzialmente alla natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza.

In un simile contesto, degno di nota è anche l'avvenuto sequenziamento, a partire da uno dei campioni rivelatisi positivi, di un genoma completo di PCV3, il quale risulta diverso da tutte le altre sequenze attualmente disponibili. Ciò fa propendere fortemente per l'ipotesi che la storia evolutiva di PCV3 abbia radici molto più antiche rispetto alla sua scoperta: si tratta dell'ennesima somiglianza con PCV2, la cui circolazione è stata dimostrata antecedere di decenni l'improvvisa affermazione di questo virus come patogeno su scala globale (Segalés et al., 2013).

I dati raccolti rappresentano quindi un promettente punto d'inizio per lo studio di questo microrganismo emergente.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B. (2013) "Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model". *Prev. Vet. Med.* 110, 88–102.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q. (2017) "Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 3 Strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, Isolated from China". *Genome Announc.* 5, e00100-17.
- Fournié, G., Kearsley-Fleet, L., Otte, J., Pfeiffer, D.U. (2015) "Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agents". *Vet. Res.* 46, 114.
- Franzo, G., Legnardi, M., Centelleghes, C., Tucciarone C.M., Cecchinato, M., Cortey, M., Segalés, J., Drigo, M. (2018) "Development and validation of direct PCR and real-time quantitative PCR assays for the rapid, sensitive, and economical detection of porcine circovirus 3 (PCV3)". *J. Vet. Diagn. Invest.*, In press.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q. (2017) "Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China". *Transbound. Emerg. Dis.* 64(3), 703-708.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016) "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets". *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kwon, T., Yoo, S.J., Park, C.-K., Lyoo, Y.S. (2017) "Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations". *Vet. Microbiol.* 207, 178–180.

- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M. (2017) "A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure". *J. Virol.* 91, e01879-16.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., Delwart, E. (2016) "Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation". *Virol. J.* 13, 184.
- Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013) "The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?" *Vet. Microbiol.* 165, 13–20.
- Shen, H., Liu, X., Zhang, P., Wang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liang, P., Song, C. (2017) "Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China". *Transbound. Emerg. Dis.* 65(1), 264-266.
- Stadejek, T., Woźniak, A., Milek, D., Biernacka, K. (2017) "First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland". *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1350–1353.
- Team, R.C., 2016. R Language Definition.
- Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S., Werling, D. (2014) "Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart". *Genome Announc.* 2(2), e00156-14.

LESIONI CUTANEE AL MACELLO NEL SUINO PESANTE: INDICATORI DI BENESSERE E DIFETTI SUI PROSCIUTTI

SKIN LESIONS MONITORING AT SLAUGHTER ON HEAVY PIGS: WELFARE INDICATORS AND HAM DEFECTS

BOTTACINI M.^{1,2}, SCOLLO A.^{2,3}, VELOCİ M.², CONTIERO B.¹, PACE V.⁴,
GOTTARDO F.¹

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

²Suivet, Reggio Emilia, Italia; ³Swivet Research, Reggio Emilia, Italia; ⁴OPAS Società
Cooperativa Agricola, San Giorgio, Mantova, Italia

Parole chiave: lesioni cutanee, difetti sui prosciutti, monitoraggio al macello

Key words: skin lesions, ham defects, slaughterhouse monitoring

Riassunto: Le lesioni cutanee nei suini sono un problema sia di benessere animale che di tipo economico. L'obiettivo di questo studio è stato di analizzare la prevalenza di diverse lesioni esterne sulla carcassa di suini di 170 kg dopo la macellazione, valutando la possibilità di utilizzarle come indicatori di benessere. Un'ulteriore analisi è stata condotta per verificare la possibile associazione tra lesioni cutanee e difetti dei prosciutti. Durante un periodo di 12 mesi, 732 lotti di suini pesanti provenienti da 267 allevamenti intensivi del Nord Italia sono stati monitorati al macello per graffi cutanei, ematomi esterni, lesioni a coda ed orecchie e bursiti. È stata rilevata una mediana del 64% e una media del 46,4% di carcasse per lotto con graffi gravi rispettivamente sulla parte anteriore e posteriore della carcassa. La stagione e il tempo di sosta hanno entrambi influito sulla prevalenza della maggior parte dei parametri considerati. L'autunno è risultato la stagione peggiore sia per i graffi che per i difetti dei prosciutti, e a questo comune andamento si aggiunge la correlazione positiva tra graffi gravi posteriori ed ematomi sui prosciutti. Per la prevalenza dei diversi parametri è stata individuata una differenza significativa tra suini pesanti italiani DOP (denominazione di origine protetta) e suini pesanti non rientranti nel disciplinare. Le lesioni cutanee sono risultate idonee per l'utilizzo come indicatori *iceberg* del benessere animale.

Abstract: Skin lesions are a welfare problem for pigs with economic losses for producers and abattoirs. The aim of the present study was to analyse the prevalence of different external carcass lesions on heavy pigs (170 kg) after slaughter, evaluating the feasibility to use them as welfare indicators. A further analysis was performed to verify the possible link between skin damages and ham defects. During a 12 months sampling period, 732 batches of heavy pigs from 267 intensive farms located in the North of Italy were monitored at slaughterhouse for skin scratches, external hematomas, ear and tail lesions and bursitis. An annual median of 64% and a mean of 46,4% of carcasses per batch respectively with severe anterior and posterior scratches was found. Season and lairage affected the prevalence of most of the considered parameters. Autumn was the worst season both for skin scratches and total ham defects, and this overlap was actually supported by a positive correlation between severe posterior scratches and ham hematomas. A difference between PDO (protected designation of origin) Italian heavy pigs and heavy pigs out of the circuit was found for the prevalence of different parameters. This study confirms that skin lesions can be used as welfare iceberg indicators for heavy pigs.

INTRODUZIONE

Il monitoraggio delle lesioni cutanee al macello si è rivelato uno strumento utile per la valutazione della salute e del benessere animale in allevamento, potendo essere utilizzate come indicatori *iceberg* [1]. L'ispezione al macello può quindi diventare uno strumento per migliorare il benessere animale dall'allevamento alla macellazione, prevenendo inoltre delle lesioni cui sono associate perdite economiche [2].

Nella realtà del suino pesante italiano, le lesioni cutanee potrebbero essere più frequenti rispetto a realtà straniere in cui si macella a pesi più leggeri: il raggiungimento della maturità sessuale (per quanto riguarda le femmine) e la diminuzione dello spazio individuale (1m²/animale oltre 110 kg di peso), vista la mancanza di regolamentazione normativa per le categorie di peso superiori, potrebbero rappresentare dei fattori di rischio.

La maggior parte delle lesioni traumatiche rilevate sulla cute in catena di macellazione sono principalmente dovute ai combattimenti a seguito del mescolamento di suini appartenenti a gruppi diversi. Lo stress causato dal trasporto [3], dal digiuno e dal tempo trascorso in stalla di sosta [4] unitamente alle condizioni ambientali [5] possono influire negativamente sul comportamento dei suini, risultando in un aumento delle lesioni cutanee.

Attraverso un monitoraggio sistematico in catena di macellazione, si è voluto descrivere la prevalenza di queste lesioni in suini di 170 kg (della filiera DOP e non) per valutarne l'utilizzo come indicatori di benessere, registrando parallelamente la frequenza delle difettosità dei prosciutti riconducibili agli stessi lotti. Nelle successive analisi sono stati considerati la stagione di macellazione e il tempo di sosta.

MATERIALE E METODI

Da gennaio a dicembre 2016 in un macello con sede in Emilia Romagna sono stati monitorati settimanalmente suini di circa 170 kg provenienti da ingrassi situati nel Nord Italia. Complessivamente sono state esaminate le carcasse di 732 lotti (circa 100 suini per lotto) provenienti da 267 allevamenti, di cui 648 lotti di suini pesanti italiani destinati alle DOP e 84 lotti di suini pesanti smarchiati nati prevalentemente all'estero ed ingrassati in allevamenti nazionali. Un unico veterinario, attraverso l'ispezione visiva delle carcasse prima della separazione in mezzene, ha registrato le frequenze delle lesioni cutanee direttamente su di un foglio Excel utilizzando un *tablet*.

Per il monitoraggio delle lesioni traumatiche acute (graffi) la carcassa è stata divisa in due parti: la parte posteriore, individuata nella sola coscia (per avere un dato confrontabile con le difettosità dei prosciutti) e quella anteriore per la parte rimanente. Per attenersi alla velocità della catena di macellazione (480 suini/ora) è stato scelto un sistema a tre valori per determinare in breve tempo il punteggio: 0 = fino ad un graffio o morso; 1 = da due a cinque graffi o morsi; 2 = più di cinque graffi o morsi, o la presenza qualsiasi ferita penetrante nel muscolo (versione adattata del *Welfare Quality Protocol* [6]). Oltre alla rilevazione dei graffi è stata registrata la presenza di ematomi sull'intera carcassa. Lesioni come tagli, necrosi, morsi e cicatrici su orecchie (escludendo i graffi recenti) e coda, e la presenza di bursiti sugli arti anteriori (essendo all'altezza dell'operatore) sono state annotate come indicatori *iceberg* del benessere animale in allevamento.

Il giorno successivo alla macellazione sono state controllate tutte le cosce dei lotti di suini precedentemente monitorati, secondo gli standard dell'Istituto Parma Qualità e classificandole per la presenza di difetti (massimo uno per ogni coscia) che ne causano l'esclusione dal mercato delle cosce DOP. Sono stati presi in considerazione solo i difetti di origine traumatica (ematomi; strappi muscolari; anchette rotte) e quelli

legati allo stress (carne PSE=*pale, soft, essudative*; petecchie emorragiche, venature). La tracciabilità delle cosce attraverso il tatuaggio o la timbratura è stata garantita per mantenere la corrispondenza con i lotti di suini precedentemente monitorati.

Per tutti i lotti, i dati normalmente distribuiti sono stati elaborati mediante analisi della varianza (PROC GLM di SAS) utilizzando un modello che ha considerato l'effetto della stagione di macellazione e del tempo di sosta, che è stato dicotomizzato in due livelli: macellazione giornaliera vs stabulazione prolungata (scaricati il tardo pomeriggio e macellati il mattino seguente). La variazione legata all'allevamento di provenienza è stato inserito come effetto *random*. I dati non normalmente distribuiti sono stati elaborati con test non parametrici. La relazione tra diverse lesioni e difetti è stata verificata utilizzando il test di correlazione di *Spearman*.

Inizialmente sono stati considerati solo i lotti di suini destinati alla DOP (n=638), mentre nella seconda fase analitica sono stati presi in considerazione anche i lotti di suini smarchiati (n=84) per poter effettuare un confronto tra i due diversi tipi produttivi. Dal momento che solo 2 lotti di suini smarchiati sono stati campionati in inverno, tutti i lotti macellati in questa stagione (DOP e smarchiati) sono stati esclusi da questa ulteriore analisi. I lotti di suini smarchiati sono sempre stati macellati in giornata, per cui anche tutti i lotti di suini per la DOP che hanno effettuato una stabulazione prolungata sono stati esclusi, arrivando ad avere 256 lotti di suini per la DOP e 82 lotti di suini smarchiati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In questo studio è emerso che al 64,0% delle carcasse per lotto è stato attribuito un punteggio 2 (graffi gravi) nella parte anteriore, mentre lo stesso punteggio è stato attribuito al 46,4% delle cosce, evidenziando come queste lesioni rappresentino un serio problema anche nella produzione del suino pesante italiano (tabella 1). Risulta tuttavia difficile effettuare dei paragoni quantitativi con altri studi viste le diverse scelte sulla metodologia di punteggio. Sia la stagione di macellazione che il tempo di sosta hanno avuto un forte effetto sull'andamento della maggior parte delle variabili, mentre non è emersa alcuna interazione tra questi due fattori. La variabilità attribuibile all'allevamento di provenienza è risultata del 13-20% per i graffi sulla carcassa e del 44% per la presenza di difetti traumatici e legati allo stress, evidenziando come possano essere coinvolti alcuni fattori aziendali.

L'autunno è risultata la stagione peggiore sia per i graffi che per i difetti dei prosciutti: questo comune andamento viene supportato dalla correlazione positiva ($r=0,27$) riscontrata tra graffi gravi sulla coscia ed ematomi sui prosciutti. Nonostante ci si aspettasse valori di correlazione più elevati, questi potrebbero essere stati compromessi da una posizione dell'osservatore in catena di macellazione troppo bassa per una buona visualizzazione delle cosce, risultando in una ridotta sensibilità, che si conferma confrontando gli ematomi rilevati sulla carcassa (0%) e quelli mediante la classificazione dei prosciutti (3,29%).

Tabella 1
Prevalenza di diverse lesioni cutanee in 648 lotti di suino pesante italiano. I valori annuali e stagionali sono riportati come mediana e l'intervallo tra parentesi (dati non parametrici) o media $\pm$ l'errore standard (dati normalmente distribuiti) corretto per l'effetto allevamento.
Prevalence of different skin lesions in 648 batches of heavy Italian pigs. Yearly and seasonal values are shown as median and range in brackets (non-parametric data) or mean $\pm$ standard error (normally distributed data) corrected for the effect of farm.

	Annuale (n=648)	Primavera (n=163)	Estate (n=161)	Autunno (n=156)	Inverno (n=168)	SEM	P-value stagione	F o K	Effetto allevamento %variazione
Lesioni da combattimenti:									
anteriore, punteggio 2 ¹ (%)	64 (0-100)	49 (2.17-94.74) ^c	74.73 (0-100) ^b	100 (0-100) ^a	23 (0-100) ^d		<0.001	306.55	
posteriore, punteggio 2 ¹ (%)	46.41 $\pm$ 24.74	43.38 ^b	49.02 ^b	64.72 ^a	28.52 ^c	1.76	<0.001	89.25	20.05
Punteggio medio carcassa	1.20 $\pm$ 0.55 ^e	1.1 ^c	1.29 ^b	1.71 ^a	0.72 ^d	0.03	<0.001	173.62	13.4
Ematomi (%)	0 (0-2)	0 (0-1.3)	0 (0-1.22)	0 (0-1.11)	0 (0-2)		0.5	2.36	
Indicatori Iceberg:									
Lesioni orecchie ² (%)	10 (0-99)	14 (0-97) ^a	9.14 (0-80) ^{bc}	8 (0-99) ^c	10.81 (0-98.55) ^{ab}		<0.001	26.75	
Lesioni coda (%)	0 (0-41)	0 (0-5.33) ^a	0 (0-10) ^a	0 (0-19.67) ^a	0 (0-41) ^b		0.003	14.29	
Bursiti (%)	1 (0-10)	1.11 (0-7) ^a	1.01 (0-9.18) ^{ab}	1 (0-6.25) ^{bc}	1 (0-10) ^c		<0.001	35.86	

1^o: più di cinque graffi o qualsiasi ferita penetrante il muscolo; 2^o: i graffi recenti non sono considerati.
a,b,c,d,e: valori sulla stessa riga con lettere diverse differiscono significativamente (P<0.05).

1^o: more than five scratches or any wound which penetrates the muscle; 2^o: recent scratches were not considered.
a,b,c,d,e: values within the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

L'elevata prevalenza di graffi riscontrata in autunno conferma i risultati di Gosálvez et al. [7]. Correa et al. [8] hanno riscontrato una più alta prevalenza di escoriazioni riferibili ai combattimenti e alla monta durante l'estate rispetto alle prove condotte nei mesi invernali, che hanno registrato tuttavia la più alta prevalenza di lesioni cutanee totali. L'inverno è infatti indicata da alcuni autori come la stagione più problematica: questa più elevata prevalenza invernale è stata associata alla più frequente stazione quadrupedale durante il trasporto in condizioni di bassa temperatura ambientale, combinato con la scivolosità delle superfici in condizioni di elevata umidità. Nonostante nel presente studio vi sia stato un aumento delle anchette rotte sui prosciutti durante l'inverno (che potrebbe essere associato a più frequenti scivolamenti), considerando solo le lesioni cutanee riferibili ai combattimenti, i nostri risultati sembrano in apparente contrasto con la tesi invernale, dal momento che l'inverno è risultata la stagione con la più bassa prevalenza di graffi. Ciò che differenzia il nostro studio dagli altri è però la durata continuativa del campionamento nell'arco di 12 mesi, oltre alla differenza nella temperatura media rispetto ad altri Paesi. Inoltre l'elevato peso di macellazione nella produzione del suino pesante italiano può contribuire a rendere le basse temperature più sopportabili per questi animali rispetto a quelli macellati a pesi più leggeri, ridimensionando l'effetto della temperatura nei mesi freddi.

Un'altra importante differenza legata all'età e al peso di macellazione è il raggiungimento più o meno completo della maturità sessuale (normalmente raggiunta dopo i 7 mesi di vita), che in femmine all'ingrasso non stimolate potrebbe essere anticipata o posticipata a seconda del fotoperiodo, anche se la sua influenza rimane controversa. La più alta prevalenza di graffi rilevata in autunno potrebbe essere quindi spiegata con un aumento dei comportamenti legati alla manifestazione dell'estro in questa stagione, che potrebbero essere più evidenti in femmine macellate a 270 giorni rispetto a quelle più giovani e di peso inferiore. Gli ormoni sessuali determinano interazioni più aggressive e lesioni cutanee più gravi al confronto con femmine macellate allo stesso peso ma immuno-castrate [9].

La più bassa prevalenza di graffi rilevata in inverno e quella più alta in autunno potrebbero essere giustificate anche dalla media stagionale del numero di suini macellati giornalmente nella struttura ospitante, dal momento che dall'inizio dell'anno (inverno) si è passati da 4665 ai 4823 degli ultimi 3 mesi di campionamento (coincidenti con l'autunno). Questa differenza potrebbe avere influenzato la qualità e la durata delle operazioni di carico e scarico prima della macellazione, determinando più stress e la manifestazione di comportamenti più aggressivi nei suini macellati nei periodi di lavoro più intenso.

Il prolungamento del tempo di sosta, e conseguentemente del digiuno, è risultato in un aumento della prevalenza di graffi (tabella 2), soprattutto se consideriamo la parte anteriore della carcassa, indicativa di attacchi frontali e laterali [8], confermando precedenti risultati sul suino pesante italiano [10]. È ben documentato anche come lunghi periodi di digiuno risultino in un aumento dell'aggressività [4].

Tabella 2

Prevalenza di diverse lesioni cutanee in 648 lotti di suino pesante italiano. I valori riferiti alla macellazione giornaliera o alla sosta prolungata sono riportati come mediana e l'intervallo tra parentesi (dati non parametrici) o media $\pm$ l'errore standard (dati normalmente distribuiti) corretto per l'effetto allevamento. Prevalence of different skin lesions in 648 batches of heavy Italian pigs. The values referred to daily slaughter or overnight lairage batches are shown as median and range in brackets (non-parametric data) or mean (normally distributed data) corrected for the effect of farm.

	Macellazione giornaliera (n=358)	Sosta prolungata (n=290)	SEM	P-value tempo di sosta	F o U	Effetto allevamento %variazione
Lesioni da combattimenti:						
anteriore, punteggio 2 ¹ (%)	58 (0-100) ^b	70.21 (0-100) ^a		0,02	51703	
posteriore, punteggio 2 ¹ (%)	44,82	48	1,59	0,088	2,93	20,05
Punteggio medio carcassa	1,17	1,24	0,03	0,043	4,14	13,4
Ematomi (%)	0 (0-2)	0 (0-1,11)		0,331	46211	
Indicatori Iceberg:						
Lesioni orecchie ² (%)	9 (0-99) ^b	11,35 (0-98,55) ^a		0,011	52314	
Lesioni coda (%)	0 (0-41)	0 (0-8)		0,317	48236	
Bursiti (%)	1 (0-10) ^b	1 (0-9,18) ^a		<0,001	55852	

¹: più di cinque graffi o qualsiasi ferita penetrante il muscolo; ²: i graffi recenti non sono considerati.

a,b: valori sulla stessa riga con lettere diverse differiscono significativamente (P<0.05).

¹: more than five scratches or any wound which penetrates the muscle; ²: recent scratches were not considered.

a,b: values within the same row with different superscripts differ significantly (P<0.05).

Tra le variabili in grado di fornire informazioni sul benessere animale in allevamento, solo le lesioni alle orecchie hanno registrato una prevalenza numericamente rilevante (10%), indicando un frequente problema di necrosi e/o morsicatura. Il forte effetto della stagione di macellazione, con il picco di lesioni in primavera, potrebbe essere dovuto al riscontro di lesioni croniche e spesso cicatrizzate che possono essere datate alle fasi di allevamento molto antecedenti alla macellazione, corrispondenti all'autunno e all'inverno: stagioni che possono determinare un rischio più elevato di necrosi alle orecchie a causa dell'elevata umidità ambientale [11].

Nonostante le lesioni alla coda siano state individuate assieme alle lesioni cutanee come indicatori *iceberg* del benessere animale [1], queste sono state raramente riscontrate (mediana=0), confermando lo 0,18% di lesioni registrate in svezzamento e in ingrasso da Scollo et al. [12], che impedisce di fatto di sfruttarne il potenziale informativo. L'applicazione del taglio della coda viene applicato sistematicamente nella maggioranza degli allevamenti italiani, limitando le morsicature e quindi le lesioni. Tuttavia considerando la crescente percentuale di suini con coda lunga in Italia, il potenziale di questo indicatore potrà essere riconsiderato in futuro.

La prevalenza di bursiti è stata inferiore rispetto a quanto riportato da Harley et al. [13] nelle osservazioni al macello, nonostante il più elevato peso alla macellazione dei suini italiani potesse essere un fattore di rischio aggiuntivo. La velocità della catena di macellazione e il tempo impiegato per le altre rilevazioni possono avere influito sulla sensibilità dell'osservatore, che probabilmente ha annotato solo le bursiti gravi e quindi più evidenti. Visti i risultati, possiamo dire tuttavia che l'elevato peso di macellazione non sembra determinare una prevalenza di bursiti più elevata rispetto ai suini macellati a 110 kg.

Come riportato in tabella 3, si evidenzia come i difetti sui prosciutti, di origine traumatica e legati allo stress, con una media annuale dell'8,73% rappresentino un problema economico rilevante per l'industria suinicola italiana, che non può indirizzare queste cosce al mercato delle DOP. Gli ematomi sui prosciutti hanno registrato un calo rispetto a precedenti indagini condotte nello stesso impianto (2013: 6,2%) [14], indicando un miglioramento delle procedure di gestione degli animali. Eccezione fatta per le venature, che hanno registrato il minimo in estate anche nel presente studio, il nostro andamento stagionale non è coerente con quello riportato da Arduini et al. [14] per altri difetti, suggerendo il coinvolgimento di altri fattori stagionali non strettamente legati alle condizioni ambientali. La carne PSE, nonostante una prevalenza massima del 4,87%, non è stata rilevata nella maggior parte dei lotti, riflettendo i miglioramenti che sono stati raggiunti nella genetica e nella gestione relativamente a questo difetto. La stabulazione prolungata è risultata associata ad una diminuzione delle anchette rotte e delle petecchie, con un apparente effetto preventivo, mentre è risultata in un aumento delle venature (tabella 4).

Tabella 3

Prevalenza di diversi difetti sui prosciutti in 648 lotti di suino pesante italiano. I valori annuali e stagionali sono riportati come mediana e l'intervallo tra parentesi (dati non parametrici) o media $\pm$ l'errore standard (dati normalmente distribuiti) corretto per l'effetto allevamento.
Prevalence of different ham defects in 648 batches of heavy Italian pigs. Yearly and seasonal values are shown as median and range in brackets (non-parametric data) or mean $\pm$ standard error (normally distributed data) corrected for the effect of farm.

	Annuale (n=648)	Primavera (n=163)	Estate (n=161)	Autunno (n=156)	Inverno (n=168)	P-value stagione	F o K	Effetto allevamento %variazione
Classi riassuntive:								
Difetti traumatici (%)	4.74 (0-35.11)	4.78 (0.42-21.01) ^{ab}	4.71 (0-21.77) ^b	5.21 (0.27-35.11) ^a	4.31 (0-17.98) ^b	0.005	12.82	
Difetti traumatici + legati allo stress (%)	8.73 $\pm$ 4.74	9.78 ^a	8.18 ^b	9.91 ^a	8.96 ^{ab}	0.41	5.58	43.56
Difetti traumatici:								
Ematomi (%)	3.29 (0-33.59)	3.59 (0.36-16.34) ^{ab}	3.20 (0-16.60) ^{bc}	3.78 (0-33.59) ^a	2.79 (0-16.67) ^c	<0.001	17.81	
Strappi (%)	1 (0-9.39)	1.14 (0-9.17)	0.85 (0-7.57)	1.11 (0-9.39)	0.93 (0-9.04)	0.304	3.72	
Anchetta rotta (%)	0 (0-2.12)	0 (0-1.08) ^{ab}	0 (0-2.12) ^b	0 (0-0.99) ^{ab}	0 (0-2.11) ^a	0.021	9.63	
Difetti legati allo stress:								
PSE (%)	0 (0-4.87)	0 (0-3.59) ^a	0 (0-2.80) ^a	0 (0-4.87) ^a	0 (0-3.74) ^b	<0.001	21.99	
Petecchie (%)	0.67 (0-6.79)	0.70 (0-5.46) ^{ab}	0.78 (0-6.79) ^a	0.76 (0-6.18) ^a	0.43 (0-3.58) ^b	<0.001	20.96	
Venature (%)	1.64 (0-20.66)	1.98 (0-20.66) ^a	1.02 (0-12.5) ^b	1.81 (0-11.61) ^a	2.10 (0-19.10) ^a	<0.001	50.73	

^{a,b,c,d}: valori sulla stessa riga con lettere diverse differiscono significativamente ($P<0.05$); ^{a,b,c,d}: values within the same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

Tabella 4

Prevalenza di diversi difetti sui prosciutti in 648 lotti di suino pesante italiano. I valori riferiti alla macellazione giornaliera o alla sosta prolungata sono riportati come mediana e l'intervallo tra parentesi (dati non parametrici) o media $\pm$ l'errore standard (dati normalmente distribuiti) corretto per l'effetto allevamento.
Prevalence of different ham defects in 648 batches of heavy Italian pigs. The values referred to daily slaughter or overnight lairage batches are shown as median and range in brackets (non-parametric data) or mean (normally distributed data) corrected for the effect of farm.

	Macellazione giornaliera (n=358)	Sosta prolungata (n=290)	SEM	P-value tempo di sosta	F o U	Effetto allevamento %variazione
Classi riassuntive:						
Difetti traumatici (%)	4.72 (0.42-15.36)	4.80 (0-35.11)		0.843	48922	
Difetti traumatici + legati allo stress (%)	9.1	9.32	0.36	0.61	0.26	43.56
Difetti traumatici:						
Ematomi (%)	3.31 (0-14.55)	3.27 (0-33.59)		0.342	50374	
Strappi (%)	1.01 (0-9.04)	0.97 (0-9.39)		0.631	49246	
Anchetta rotta (%)	0 (0-2.12) ^a	0 (0-1.48) ^b		<0.001	42620	
Difetti legati allo stress:						
PSE (%)	0 (0-4.87)	0 (0-3.74)		0.112	47136	
Petecchie (%)	0.84 (0-6.79) ^a	0.41 (0-3.70) ^b		<0.001	33622	
Venature (%)	1.46 (0-12.23) ^b	1.96 (0-20.66) ^a		0.002	57448	

^{a,b}: valori sulla stessa riga con lettere diverse differiscono significativamente ($P<0.05$).

^{a,b}: values within the same row with different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

Nel confronto tra suini italiani destinati alla DOP e suini smarchiati (tabella 5) si evidenzia una prevalenza più alta per i difetti dei prosciutti a scapito dei primi ($P < 0,001$), probabilmente dovuta anche alla maggiore sensibilità adottata in virtù dei stringenti requisiti dei disciplinari. Non sono emerse differenze significative nella prevalenza dei graffi, mentre i lotti di suini smarchiati hanno registrato valori più elevati di lesioni alla coda, probabilmente dovuta anche al minor utilizzo del taglio sistematico o al mantenimento di un residuo di coda più lungo. Nei lotti di suini destinati alle DOP sono state invece rilevate più lesioni alle orecchie, che potrebbero essere dovute anche ad un effetto sostituzione vista la ridotta possibilità di morsicatura della coda. Comportamenti aberranti come la morsicatura della coda, oltre ad essere condizionati dalla densità di allevamento e da ambienti poco stimolanti, sono effetti genetici collaterali indiretti della selezione per la velocità di accrescimento [15]. I suini smarchiati sono indubbiamente più performanti, e questo potrebbe contribuire ad accentuare le differenze per questi tipi di lesione. Complessivamente risulta difficile interpretare questo risultato come indicatore *iceberg* di benessere animale relativo al Paese di origine, dal momento che i suini smarchiati, anche se nati all'estero, hanno completato la fase di ingrasso in allevamenti italiani.

Tabella 5

Prevalenza annuale di diverse lesioni cutanee e difetti sui prosciutti in 256 lotti di suino pesante italiano destinato alla DOP e 82 lotti di suini smarchiati. I valori sono riportati come mediana e l'intervallo tra parentesi (dati non parametrici) o media $\pm$ l'errore standard (dati normalmente distribuiti). Yearly prevalence of different skin lesions and ham defects in 256 batches of heavy Italian pigs destined to PDO production and 82 batches of NPDO heavy pigs out of the PDO circuit. The values are shown as median and range in brackets (non-parametric data) or mean (normally distributed data).

n=338	Smarchiati (n=82)	Suino pesante italiano (n=256)	SEM	P-value	F o U
LESIONI CUTANEE:					
Lesioni da combattimenti:					
anteriore, punteggio 2 ¹ (%)	92,5 (19-100)	78,64 (1-100)		0,147	7772
posteriore, punteggio 2 ¹ (%)	46,19	50,4	2,22	0,193	1,71
Punteggio medio carcassa	1,34	1,34	0,04	0,888	0,02
Ematomi (%)	0 (0-1)	0 (0-1,3)		0,891	8800
Indicatori Iceberg:					
Lesioni orecchie ² (%)	4,69 (0-33) ^b	9 (0-99) ^a		<0,001	10908
Lesioni coda (%)	0,5 (0-15) ^a	0 (0-19,67) ^b		<0,001	6529
Bursiti (%)	1 (0-6,74)	1 (0-7)		0,954	8683
DIFETTI PROSCIUTTI:					
Classi riassuntive:					
Difetti traumatici (%)	1,87 (0-9,63) ^b	4,80 (0,42-15,36) ^a		<0,001	17251
Difetti traumatici + legati allo stress (%)	3,78	9,11	0,41	<0,001	79,91
Difetti traumatici:					
Ematomi (%)	1,10 (0-6,12) ^b	3,52 (0-14,55) ^a		<0,001	17899
Strappi (%)	0,68 (0-6,10) ^b	1,03 (0-7,57) ^a		<0,001	13062
Anchetta rotta (%)	0 (0-1,77)	0 (0-2,12)		0,426	9793
Difetti legati allo stress:					
PSE (%)	0 (0-0,39) ^b	0 (0-4,87) ^a		<0,001	14773
Petecchie (%)	0,19 (0-2,63) ^b	0,98 (0-6,79) ^a		<0,001	16355
Venature (%)	0,43 (0-3,51) ^b	1,28 (0-12,23) ^a		<0,001	14896

¹: più di cinque graffi o qualsiasi ferita penetrante il muscolo; ²: i graffi recenti non sono considerati.

^{a,b}: valori sulla stessa riga con lettere diverse differiscono significativamente ($P < 0,05$).

¹: more than five scratches or any wound which penetrates the muscle; ²: recent scratches were not considered.

^{a,b}: values within the same row with different superscripts differ significantly ($P < 0,05$).

CONCLUSIONI

Questo monitoraggio estensivo sulle lesioni cutanee al macello ne evidenzia la diffusione anche nel suino pesante, sottolineando come tutte le procedure dal carico allo stordimento siano aspetti critici per il benessere animale. Non si può ancora affermare che le lesioni dovute ai combattimenti precedenti alla macellazione siano la principale causa dei difetti riscontrati sui prosciutti, tuttavia il loro ruolo potrà essere meglio stabilito se verrà scelta una posizione di osservazione migliore in catena di macellazione. I difetti dovuti a traumi e quelli legati allo stress rappresentano la maggior parte della totalità dei difetti rilevati sui prosciutti: l'adozione delle giuste misure preventive, specialmente durante il carico in allevamento e possibilmente mantenendo l'integrità dei gruppi, potrà contribuire a ridurre la prevalenza, con un buon rapporto costo-beneficio. La stagione di macellazione e il tempo di sosta sono risultati incisivi nell'andamento di molte delle variabili analizzate. Nonostante l'utilizzo delle lesioni alla coda come indicatore *iceberg* del benessere in allevamento sarà possibile solo quando ne verrà abbandonato il taglio sistematico, questo studio conferma il macello come importante osservatorio non solo per gli aspetti sanitari, ma anche per il monitoraggio e la salvaguardia del benessere animale.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Staaveren N., Doyle B., Manzanilla E.G., Calderón Díaz J.A., Hanlon A., Boyle L.A. (2017). Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs. *Journal of Animal Science*, 95(4), 1528.
2. Faucitano, L. (2001). Causes of skin damage to pig carcasses. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(1), 39-45.
3. Gispert M., Faucitano L., Oliver M.A., Guàrdia M.D., Coll C., Siggers K., Harvey K., Diestre A. (2000). A survey of pre-slaughter conditions, halothane gene frequency, and carcass and meat quality in five Spanish pig commercial abattoirs. *Meat Science*, 55(1), 97-106.
4. Sterten H., Frøystein T., Ekker A. S., Kjos N.P. (2009). Influence of feeding regime, sex and fasting time prior to slaughter on growth rate, carcass characteristics, ultimate pH and skin damage of pigs. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*, 59(3), 142-149.
5. Arduini A., Redaelli V., Luzi F., Dall'Olio S., Pace V., Nanni Costa L. (2017). Relationship between deck level, body surface temperature and carcass damages in Italian heavy pigs after short journeys at different unloading environmental conditions. *Animals*, 7(2), 10.
6. Welfare Quality (2009). Welfare Quality® assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs). Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.
7. Gosálvez L.F., Averós X., Valdelvira J.J., Herranz A. (2006). Influence of season, distance and mixed loads on the physical and carcass integrity of pigs transported to slaughter. *Meat Science*, 73(4), 553-558.
8. Correa J. A., Gonyou H., Torrey S., Widowski T., Bergeron R., Crowe T., Laforest J.P., Faucitano L. (2013). Welfare and carcass and meat quality of pigs being transported for two hours using two vehicle type during two seasons of the year. *Can. J. Anim. Sci.* 93:4355.
9. Di Martino G., Scollo A., Garbo A., Lega F., Stefani A.L., Vascellari M., Natale A., Zuliani F., Zanardello C., Tonon F., Bonfanti L. (2017). Impact of sexual maturity on the welfare of immunocastrated v. entire heavy female pigs. *Animal*, 1-7.
10. Nanni Costa L., Lo Fiego D.P., Dall'Olio S., Davoli R., Russo V. (2002). Combined effects of pre-slaughter treatments and lairage time on carcass and meat quality in pigs of different halothane genotype. *Meat Science*, 61(1), 41-47.
11. Park J., Friendship R.M., Poljak Z., DeLay J., Slavic D., Dewey C.E. (2013). An investigation of ear necrosis in pigs. *The Canadian Veterinary Journal = La Revue Vétérinaire Canadienne*, 54(5), 491.
12. Scollo A., Contiero B., Gottardo F. (2016). Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight. *The Veterinary Journal* 207 (2016) 92-98.
13. Harley S., More S., Boyle L., Connell N.O., Hanlon A. (2012). Good animal welfare makes economic sense: Potential of pig abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool. *Irish Veterinary Journal*, 65(1), 11.
14. Arduini A., Redaelli V., Luzi F., Dall'Olio S., Pace V., Nanni Costa L. (2014). Effect of transport distance and season on some defects of fresh hams destined for DPO production. *Animals : An Open Access Journal from MDPI*, 4(3), 524-534.
15. Camerlink I., Ursinus W.W., Bijma P., Kemp B., Bolhuis J.E. (2015). Indirect genetic effects for growth rate in domestic pigs alter aggressive and manipulative biting behaviour. *Behav. Gen.*, 45, 117-126.

UN NUOVO APPROCCIO ALLA VALUTAZIONE DEL CONDIZIONAMENTO DELLE SCROFETTE PER IL CONTROLLO DELLA PRRS

A NEW APPROACH TO THE EVALUATION OF GILT ACCLIMATION FOR THE CONTROL OF PRRS

AMADORI M.¹, DRIGO M.², GIACOMINI E.³, LAZZARO M.³, PASOTTO D.²,
BILATO D.¹, RUGGERI J.³, BONIOTTI M.B.⁴, FERLAZZO G.¹, ALBORALI G.L.³

¹Laboratorio di Immunologia Cellulare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della
Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia;

²Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi
di Padova, viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italia;

³Sezione Diagnostica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia
Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia;

⁴Laboratorio di Genomica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e
dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia.

Parole chiave: PRRS, scrofette, condizionamento.

Key words: PRRS, gilts, acclimation.

Riassunto: La Sindrome Riproduttiva Respiratoria del suino (PRRS) è un modello complesso d'interazione virus/ospite. La protezione clinica del suino si basa essenzialmente (A) sulla ridotta recettività dei macrofagi al virus, (B) sul controllo della risposta infiammatoria indotta dal virus in associazione ad altri stressori ambientali, infettivi e non-infettivi. Il condizionamento efficace delle scrofette deve pertanto favorire tali azioni di controllo. Abbiamo paragonato le risposte immunitarie delle scrofette in condizionamento in 4 allevamenti stabili e 2 instabili per PRRS. Le scrofette siero-negative per virus PRRS (PRRSV) si infettavano regolarmente in tutti gli allevamenti oggetto di studio. Quattro aspetti vanno sottolineati: 1) La precocità della risposta anticorpale nei fluidi orali di gruppo era del tutto simile a quella determinata sul siero di sangue; 2) la circolazione di PRRSV era presente in tutti i gruppi d'età solo negli allevamenti instabili; 3) una risposta anticorpale precoce, bilanciata in IgG e IgA nei liquidi orali, era presente solo negli allevamenti stabili; 4) una risposta precoce in IFN-gamma a PRRSV si evidenziava solo negli allevamenti stabili. La viremia da PRRSV aveva un chiaro effetto inibente la risposta IFN-gamma. Negli allevamenti instabili si notava invece una diffusa risposta IFN-gamma nei suinetti sotto scrofa, di chiara origine materna. Vi era anche correlazione tra risposta IgA nei liquidi orali e cessazione dell'escrezione di PRRSV.

Abstract: The Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) is a complex model of host/virus relationship. Clinical protection of pigs is based: (A) on reduced susceptibility of macrophages to PRRSV infection and replication; (B) on the control over the inflammatory response caused by PRRSV and other environmental, infectious and non-infectious stressors. Therefore, successful acclimation of gilts should be conducive to such control actions. In order to establish correct parameters of evaluation, we compared the dynamics of the immune responses of gilts in four PRRS-stable and two unstable farms. PRRS-free gilts got regularly infected after entering PRRS-stable and unstable farms. Four main results should be highlighted: A) the precocity of the antibody response in oral fluids was generally similar to that recorded in sera; B) circulation of PRRSV was consistently detected in all age groups in unstable herds, only;

C) an early, balanced, IgA and IgG response in oral fluids was only observed in PRRS-stable herds; D) an early IFN-gamma response after PRRSV infection was detected in PRRS-stable herds, only. This response was also observed in suckling piglets of unstable herds, likely due to transfer of maternal immunity. Furthermore, the mucosal IgA response was associated with cessation of virus excretion in oral fluid samples.

INTRODUZIONE

La sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è ancora una delle principali cause di perdite dirette e indirette negli allevamenti di suini in tutto il mondo. L'agente eziologico (PRRS Virus, PRRSV) è un virus RNA a catena positiva della famiglia *Arteriviridae*. Mentre l'infezione da PRRSV è presente nella grande maggioranza degli allevamenti di suini, la frequenza dei casi di malattia è molto variabile. Due tipi di arterivirus suino sono stati identificati fino ad oggi come agenti eziologici: il genotipo tipo-1, europeo (UE), con il primo ceppo isolato nel 1991 e denominato "Lelystad"; il genotipo tipo-2 nordamericano (NA), isolato nel 1992 con l'acronimo ATCC VR-2332 (Nelsen et al., 1999). Numerosi segni di malattia possono essere rilevati in azienda secondo l'età del maiale e la fase di produzione: piressia, problemi respiratori, crescita lenta, diminuzione dell'alimentazione, letargia, anoressia, febbre, tosse e dispnea in tutte le età (sindrome infettiva generale); polmonite, congiuntivite, infezione batterica secondaria in suini svezzati e magroni; sindrome "Orecchio Blu", problemi riproduttivi, aborti epidemici, mortalità nelle scrofe; infertilità nei verri (Zimmerman et al., 2006).

L'infezione sperimentale delle scrofe con PRRSV in tarda gestazione riproduce costantemente la malattia, mentre in altri casi la PRRS è un modello elusivo di relazione virus/ospite, in cui la malattia conclamata è il possibile risultato finale di una complessa interazione tra ospite, virus e condizioni ambientali. Nonostante ampi studi, sorveglianza diffusa e attività di controllo nelle aziende suinicole, la PRRS rappresenta ancora una grave minaccia per la filiera suinicola, alla base di elevate perdite dirette e indirette (Holtkamp D.J. 2013).

Diversi motivi spiegano le condizioni presenti. Fondamentalmente, le misure di controllo della malattia potrebbero avere fondamenti teorici non adeguati, dal momento che i problemi critici della patogenicità del PRRSV e dell'interazione virus/ospite negli animali vaccinati e non immunizzati sono ancora mal definiti. In questo scenario, il controllo della PRRS nelle aziende infette è generalmente perseguito con procedure consolidate basate su una combinazione di misure di gestione aziendale e di biosicurezza. Queste possono essere integrate dall'uso di vaccini vivi attenuati o inattivati, nonché da programmi di acclimatamento volti ad un'esposizione controllata delle scrofette ai ceppi PRRSV circolanti in azienda prima del periodo riproduttivo.

Nel complesso, i programmi di controllo della malattia mirano alla "stabilizzazione" dell'azienda come priorità, ovvero a una condizione in cui i segni clinici della PRRS siano assenti nella popolazione dell'allevamento e PRRSV non sia più trasmesso dalle scrofe alla loro progenie (Holtkamp et al., 2011). A questo proposito, i parametri riconosciuti predittivi di protezione clinica sono in realtà carenti. In generale, vi è spesso evidenza di una scarsa risposta del sistema immunitario innato all'infezione da PRRSV, nonché di un ritardo abnorme nell'insorgenza di risposte in anticorpi neutralizzanti e interferone (IFN)-gamma (Mateu and Diaz, 2008), il che sarebbe correlato alla prolungata persistenza dei virus nell'ospite. Tuttavia, è ben noto che la cessazione della viremia da PRRSV avviene spesso prima dell'insorgenza di tali aspetti di immunità adattativa (Mateu and Diaz, 2008). Ciò fa dubitare di un ruolo importante dell'immunità adattativa dopo infezione da PRRSV.

Ci siamo pertanto chiesti quali parametri immunitari fossero correlati ad un efficace condizionamento delle scrofette introdotte in un allevamento infetto da PRRSV. Abbiamo pertanto deciso di verificare in forma comparativa il decorso temporale di fondamentali

parametri immunitari in scrofette introdotte, rispettivamente, in allevamenti stabili ed instabili per PRRS, al fine di enucleare marcatori associati ad un efficace controllo della malattia in campo.

MATERIALI E METODI

Azienda stabile (S)1. La prima parte del nostro studio è stata condotta in un'azienda suinicola a ciclo aperto con genetica PIC® - Camborough® delle scrofe, localizzata in Veneto, il cui obiettivo commerciale è vendere suinetti di peso compreso tra 30 e 35 kg, nati da 350-400 scrofe. L'allevamento introduce scrofette siero-negative per PRRSV di 4 settimane di vita ogni due mesi. Queste sono alloggiate in capannine interne per 6-7 settimane senza alcuna deliberata esposizione a PRRSV. Otto scrofette di tre successivi gruppi di rimonta sono state controllate ai seguenti tempi dopo l'arrivo: T1 = giorno 1; T2 = giorno 49 (uscita dalle capannine); T3 = giorno 63; T4 = giorno 77; T5 = giorno 91; T6 = giorno 105.

Azienda S2. Si tratta di un'azienda a ciclo aperto in Lombardia, in cui circa l'80% dei suini viene venduto a 30 kg di peso, mentre la restante parte (20%) viene allevata fino a raggiungere il peso di mercato normale (160 kg di peso) in unità di ingrasso. L'azienda ha un livello intermedio di biosicurezza, ovvero l'accesso non è strettamente regolamentato. A distanza di 20 metri circa dalle unità di magronaggio/finissaggio, scrofette sieronegative per PRRSV di 4 mesi di vita sono introdotte in un box di quarantena, dove restano per 60 giorni circa.

Azienda S3. Si tratta di un'azienda a ciclo aperto in Lombardia in cui tutti i suini sono portati a circa 30 kg di peso. L'azienda ha un livello intermedio di biosicurezza con controllo parziale degli accessi. Scrofette di rimonta di 5 mesi di vita sono introdotte ogni due mesi nell'unità gestazione senza un sistema tutto pieno/tutto vuoto. Qui le scrofette rimangono fino a circa 120 kg di peso.

Azienda S4. Questo è un sito 1 di un sistema di produzione suinicola multi-sito, in cui suinetti svezzati a 25 giorni vengono spostati nel sito 2. L'azienda ha un alto livello di biosicurezza e comprende circa 2.900 scrofe da riproduzione. La struttura di quarantena si trova a circa 1,5 km dal nucleo di riproduzione. La quarantena viene gestita come un'azienda indipendente (ingresso controllato e personale dedicato). Scrofette di rimonta sieronegative per PRRSV di 28 giorni di vita arrivano ogni due mesi e rimangono nell'unità di quarantena per tre mesi.

Nelle aziende S2/3/4 sono stati controllati da uno a quattro gruppi di scrofette da 15 soggetti l'uno ad intervalli di 15 giorni per 2-3 mesi dal momento del loro arrivo.

Azienda instabile (I)1. Azienda a ciclo aperto di genetica Goland con circa 600 scrofe che vende suinetti di circa 30 kg di peso. In presenza di buon contenimento esterno, il problema fondamentale è l'assenza di un flusso unidirezionale degli animali. Scrofette di rimonta sieronegative per PRRSV di 4 settimane di vita sono direttamente introdotte in azienda, in capannoni con animali della stessa età. Non esiste uno specifico programma di condizionamento. La presenza di diffusa malattia clinicamente conclamata al momento dello studio ci ha costretto ad eseguire uno studio cross-sezionale su diversi gruppi di animali nello stesso giorno, con età pari a 28, 42, 56 e 70 giorni di vita. Sono stati inclusi nel campionamento otto animali per gruppo.

Azienda I2. E' stata inclusa nello studio una seconda azienda instabile a ciclo chiuso con circa 1000 scrofe danesi, situata in regione Lombardia. E' un'azienda con basso livello di biosicurezza: è confinante infatti con un'azienda da ingrasso che presenta ampia circolazione di PRRSV, i cui veicoli transitano nel territorio dell'azienda I2. Non c'è quarantena: scrofette di 70 kg di peso vivo sieronegative per PRRSV sono direttamente introdotte ogni due mesi nell'unità gestazione, alloggiate in box adiacenti a quelli delle scrofe adulte. Un gruppo di 15

scrofette di rimonta è stato controllato per 6 volte ad intervalli di 15 giorni a partire dal giorno dell'arrivo in azienda.

Campioni prelevati. Da ciascun soggetto era prelevato sangue venoso in provette con e senza litio eparina per saggi, rispettivamente, di immunità cellulare e di risposta anticorpale. Liquidi orali di gruppo erano prelevati mediante cordino ad estremità sfrangiata, con esposizione variante da 1 ora (suini di 4 settimane di vita) a 20 minuti (suini di 3 mesi e più di vita).

Saggi di laboratorio. La viremia da PRRSV e la sua presenza nei liquidi orali veniva valutata mediante real time RT-PCR per il gene ORF 7, come descritto in precedenza (Drigo et al. 2014) nelle aziende S1 e I1 (limite di sensibilità per tipo PRRSV EU: 125 copie/μL). Nelle altre aziende si è impiegato invece un kit commerciale real time RT-PCR (NucleoMag® Vet kit, Macherey-Nagel, Düren, Germany) secondo le istruzioni del produttore (limite di sensibilità per tipo PRRSV EU: 0.642 copie genomiche/μL).

I titoli anticorpali sierici (espressi come indice s/p) sono stati determinati mediante kit ELISA commerciale (Herdcheck PRRS X3 Antibody Test Kit, IDEXX), secondo le istruzioni del produttore. Lo stesso kit è stato adattato ai fluidi orali introducendo nella procedura, rispettivamente, antisieri anti-IgG e IgA suine coniugati con perossidasi, e diluendo opportunamente i controlli positivi e negativi dei kit per raggiungere i consueti valori di Densità Ottica (DO) soglia. Inoltre, a differenza dei campioni di siero, i fluidi orali diluiti 1:2 sono stati fatti reagire durante la notte a 4° C con le strisce rivestite di Ag. Questa procedura era stata convalidata su fluidi orali di suini raccolti prima e dopo un'infezione intranasale sperimentale con un ceppo PRRSV EU (Amadori M., risultati non pubblicati). Sulla base dei nostri dati sperimentali, un rapporto s/p di 0,4 è stato identificato come soglia per i campioni IgG e IgA-positivi. I campioni con s/p <0,4 sono stati considerati negativi. I valori s/p specifici per IgG e IgA di ciascun campione sono stati confrontati. La risposta Ab è stata considerata sbilanciata se il valore s/p specifico per IgA era ≤ 50% di quello specifico per IgG.

La risposta cellulo-mediata dei suini a PRRSV venne valutata mediante saggio di rilascio di IFN-gamma PRRSV-specifico in campioni di sangue intero eparinato, come descritto in precedenza (Dotti et al. 2011).

Analisi statistica

La possibile associazione tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma è stata valutata mediante test esatto di Fisher (Graph Pad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). La soglia di significatività statistica era posta a $P < 0,05$.

RISULTATI

Allevamenti stabili. Nell'azienda S1, i tre gruppi di scrofette si sono infettati con PRRSV da sette (gruppo 1) a nove settimane (gruppi 2 e 3) dopo l'ingresso. Non sono state riscontrate discrepanze tra anticorpi sierici e mucosali nel rivelare l'infezione da PRRSV. Alcune scrofette del gruppo 1 sono risultate positive al test di rilascio dell'IFN-gamma dopo la sieroconversione e sono risultate negative al T6. Al contrario, alcune scrofette infettatesi più tardivamente (gruppi 2 e 3) erano ancora positive al T6. Tutti i campioni di siero e liquido orale sono risultati negativi in real time RT-PCR. Nelle altre aziende stabili PRRS (S2 - S4), i risultati sono stati in accordo con quelli dell'allevamento S1, anche se con segni distinti di circolazione del virus (vedi figura 1, che si riferisce all'azienda S3). Tutte le scrofette studiate sono rimaste in buone condizioni di salute durante il periodo di osservazione e si sono infettate in momenti diversi dopo l'arrivo, come rivelato sia dal saggio PCR che dai test anticorpali. C'era una chiara associazione negativa ($P < 0,01$) tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma, mentre né anticorpi sierici né risposte IFN-gamma erano associati alla cessazione della viremia. Analogamente a

quanto registrato nell'azienda S1, c'erano evidenti discrepanze nello sviluppo delle risposte IgA e IgG specifiche per PRRSV nei fluidi orali. L'escrezione di virus nei fluidi orali era generalmente associata a bassi rapporti s/p IgA/IgG (prevalenti risposte IgG). Ancora una volta, le analisi degli anticorpi mucosali e sierici non differivano in termini di precocità diagnostica negli allevamenti S3 e S4, mentre il siero forniva una più precoce indicazione (T2 contro T3) nell'azienda S2.

Allevamenti instabili

Nell'azienda instabile I1, era in corso un'ondata di aborti, elevata mortalità nei suinetti lattanti (circa il 20% di mortalità), una sindrome respiratoria nei suinetti svezzati, ridotta fertilità (tasso di portata al parto 80%) nel periodo del nostro studio. In accordo con i risultati clinici, i suini erano infetti da PRRSV dal periodo sotto scrofa in poi, come dimostrato dai saggi sierologici e molecolari. Tutti i maiali tranne quelli di 70 giorni di vita erano sia viremici che escretori tramite i liquidi orali. Con l'eccezione di un solo suino, l'immunità cellulo-mediata non è stata evidenziata dopo il primo campionamento (a 28 giorni di età). La risposta anticorpale nei campioni di liquido orale era peculiare. Dopo l'infezione nel periodo di allattamento, la risposta Ab è stata sostanzialmente sbilanciata verso l'isotipo IgG (derivante da trasudato sierico) per 10 settimane circa. Solo nei suini di 70 giorni era possibile rilevare una risposta equilibrata in IgA e IgG in campioni di liquido orale, associata all'assenza di escrezione di PRRSV.

Nell'azienda instabile I2, circa il 15% dei suinetti svezzati presentava cianosi cutanea nelle regioni della coscia e dell'orecchio, oltre a ottundimento del sensorio e febbre. La mortalità si è attestata a questo stadio al 10%. Per quanto riguarda il comparto riproduzione, durante il nostro studio sono stati osservati un tasso di aborto del 15% nell'ultimo terzo della gravidanza e un aumento di nidiata con malattia. Inoltre, la mortalità nelle scrofe è salita al 4%. C'è stata una sieroconversione precoce di scrofette al T2 e persistenza di elevati titoli di anticorpi fino a T6. La viremia persisteva a titoli alti tra T2 e T5. Non si è verificata alcuna escrezione di virus in liquidi orali a T2, al contrario di T3 e T4, il che ancora una volta ha coinciso con l'aumento di IgG e con la riduzione di IgA nei liquidi orali. La risposta IFN-gamma era soppressa in presenza di viremia a T2, T3 e T4 ed è parzialmente ripresa in suini non viremici a T5 e T6 ($P < 0,001$).

DISCUSSIONE

Le indagini in campo condotte in allevamenti stabili e instabili per PRRS hanno evidenziato differenze fondamentali tra i due tipi di allevamenti in termini di caratteristiche cliniche, stato virologico e risposta immunitaria adattativa all'infezione da PRRSV.

In primo luogo, la risposta IFN-gamma a PRRSV oltre il periodo sotto scrofa o non è stata osservata o era ritardata in modo abnorme nelle due aziende instabili oggetto di studio. L'alta prevalenza di campioni positivi al test nel gruppo di suini di 28 giorni nell'azienda I1 era probabilmente dovuta al trasferimento materno di linfociti T specifici per PRRSV, in accordo con i modelli consolidati di trasferimento materno dell'immunità cellulo-mediata nei suini (Bandrick et al. 2014). In particolare, si è dimostrata un'associazione negativa tra viremia PRRSV e risposta IFN-gamma dei suini, in accordo con le ben note proprietà immunosoppressive di PRRSV (Thanawongnuwech et al., 2000; Xiao et al., 2004).

L'infezione da PRRSV era rilevata con efficienza e precocità simili con test anticorpali su siero e su campioni di liquido orale. Paragonando i risultati nei due saggi, 1-2 suini su 8 potrebbero essere sufficienti per rilevare l'infezione nel cordino di gruppo. La cosa più importante è che le risposte anticorpali specifiche per isotipo nei campioni di liquido orale sono risultate diverse tra allevamenti stabili e instabili. In particolare, un profilo equilibrato di risposta anticorpale dopo l'infezione (rapporto IgA/IgG intorno a 1) era osservato precocemente nell'azienda S1, ovvero proprio all'inizio dello studio (gruppo di scrofette 2), dopo 40 giorni (gruppo 1) e 30 giorni (gruppo 3), circa.

La risposta IgA era simile nell'azienda S4 e meno pronunciata invece nelle aziende S2 e S3. Invece, dopo l'infezione nel periodo sotto scrofa in azienda I1, un rapporto IgA/IgG bilanciato è stato osservato solo nei suini di 70 giorni, il che coincideva con la mancata escrezione di PRRSV nei campioni di liquido orale e, presumibilmente, con un minore ricircolo di virus nel gruppo. Inoltre, nelle aziende S2 e S3 (gruppo di scrofette 2), l'escrezione del virus è stata sempre registrata in presenza di bassi rapporti IgA/IgG.

L'escrezione di PRRSV in campioni di liquido orale non era sempre correlata alla viremia, il che indica un ruolo importante dei tessuti linfoidi della cavità orale come nicchia di macrofagi che ospitano a lungo il virus (O'Sullivan et al., 2011). Ciò conduce ad una sostanziale rivalutazione dei campioni di liquido orale per il monitoraggio del condizionamento delle scrofette di rimonta. Tale monitoraggio è tuttora basato sulla verifica della viremia PRRSV come indicatore di un contatto efficace con il virus di campo. Sulla base dei nostri risultati, possiamo affermare che si tratta di un approccio non esaustivo al problema per due ordini di motivi:

1. Un efficace condizionamento delle scrofette può decorrere anche in assenza di viremia. Le caratteristiche di virulenza dei ceppi virali e/o la permissività d'ospite sono alla base del diverso decorso dell'infezione virale.
2. L'enfasi eccessiva sulla viremia può distogliere l'attenzione da due parametri fondamentali di valutazione: (a) la sensibilizzazione dell'immunità cellulare e (b) l'attivazione della risposta immuno-secretoria IgA nei liquidi orali. Quest'ultimo aspetto manifesta un'evidente correlazione con il blocco della disseminazione virale tramite i liquidi orali. Bisognerà stabilire in futuro se si tratta di un effetto antivirale diretto o mediato da una modulazione negativa della recettività dei macrofagi al PRRSV. Al di là di tale aspetto, prove *in vitro* su macrofagi alveolari suini hanno dimostrato che le IgA secrete purificate anti-PRRSV hanno cospicua attività antivirale a differenza delle IgG, che addirittura possono amplificare l'infezione virale (Ruggeri, Ferlazzo, 2017, dati non pubblicati).

Una nota di cautela deve essere espressa riguardo alle differenze d'età delle scrofette avviate alla rimonta aziendale. I nostri risultati indicano che i parametri immunitari favorevoli di cui sopra (risposte IgA e IFN-gamma) hanno bisogno di tempo per instaurarsi stabilmente durante il condizionamento. In questo senso, la dinamica di sviluppo di tali parametri potrebbe essere sostanzialmente diversa tra scrofette di età diversa, come anche suggerito dai nostri risultati. Inoltre, cicli di condizionamento tardivi potrebbero comportare in situazioni aziendali "problema" rischi sanitari sostanziali dopo l'avvio delle scrofette alla fase riproduttiva. Alla base di tali rischi vi sarebbe per l'appunto un incompleto dispiegamento dei processi di maturazione della risposta immunitaria.

In accordo con i dati da noi forniti in passato (Amadori, Razzuoli, 2014), tale maturazione porterebbe ad uno stato di ridotta/nulla recettività dei macrofagi all'infezione virale, accompagnato da un controllo sostanziale della risposta infiammatoria indotta da PRRSV in associazione a batteri, endotossina batterica ambientale, stressori ambientali fisico-chimici e psicotici. Il ruolo della risposta immunitaria adattativa dopo infezione (anticorpi, linfociti T citotossici) è invece molto più incerto e scarsamente definito.

In sostanza, sulla base dei nostri risultati, è consigliabile operare il condizionamento su scrofette molto giovani, se possibile appena dopo lo svezzamento. A 4 – 6 settimane dall'ingresso in azienda, è opportuno valutare con cordino di gruppo il rapporto quali-quantitativo tra risposta IgG e IgA nei liquidi orali e verificare la presenza di reattori IFN-gamma a PRRSV. Con la stessa

provetta (frazione di plasma) è anche possibile verificare la viremia mediante real time RT-PCR. In presenza di dati positivi, con o senza viremia in atto, il gruppo potrà dirsi ben condizionato. In caso contrario, potrà essere utile ripetere i test a distanza di 4 settimane circa e valutare l'opportunità di un intervento vaccinale sui gruppi a rischio qualora essi non siano viremici. Tale schema di lavoro può comportare una migliore valutazione dell'idoneità delle scrofette all'ingresso in riproduzione e determinare nel complesso un migliore controllo della PRRS nel settore.

CONCLUSIONI

- La risposta anticorpale a PRRSV è altrettanto precoce nei liquidi orali rispetto al siero di sangue.
- I suini manifestano diversi rapporti tra IgA e IgG anti-PRRSV nei liquidi orali.
- La risposta anticorpale IgA nei liquidi orali inibisce la disseminazione virale nell'ambiente tramite i liquidi orali.
- La viremia da PRRSV è associata negativamente alla risposta in IFN-gamma.
- La risposta immunitaria a virus PRRS differisce sostanzialmente tra allevamenti stabili ed instabili per PRRS.

BIBLIOGRAFIA

Amadori M., Razzuoli, E. (2014). "Immune control of PRRS: lessons to be learned and possible ways forward". *Front. Vet. Sci.* 1, article 2. doi: 10.3389/fvets.2014.00002.

Bandrick M., Ariza-Nieto, C., Baidoo, S.K., Molitor, T.W. (2014). "Colostrum antibody-mediated and cell-mediated immunity contributes to innate and antigen-specific immunity in piglets". *Dev. Comp. Immunol.* 43, 114-120.

Dotti S., Villa, R., Sossi, E., Guadagnini, G., Salvini, F., Ferrari, M., Amadori, M. (2011). "Comparative evaluation of PRRS virus infection in vaccinated and naive pigs". *Res. Vet. Sci.* 90, 218-225.

Drigo M., Franzo, G., Belfanti, I., Martini, M., Mondin, A., Ceglie, L. (2014). "Validation and comparison of different end point and real time RT-PCR assays for detection and genotyping of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". *J. Virol. Methods* 201, 79-85.

Holtkamp D.J. (2013). "Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers". *Journal of Swine Health and Production* 21, 72-84.

Holtkamp D.J., Polson, D.D., Torremorell, M., Morrison, B., Classen, D.M., Becton, L., Henry, S., Rodibaugh, M.T., Rowland, R.R., Snelson, H., Straw, B., Yeske, P., Zimmerman, J. (2011). "Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status". *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere* 39, 101-112.

Mateu E., Diaz, I. (2008). "The challenge of PRRS immunology". *Vet. J.* 177, 345-351.

Nelsen C.J., Murtaugh, M.P., Faaborg, K.S. (1999). "Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents". *J. Virol.* 73, 270-280.

O'Sullivan T., Friendship, R., Blackwell, T., Pearl, D., McEwen, B., Carman, S., Slavic, D., Dewey, C. (2011). "Microbiological identification and analysis of swine tonsils collected from carcasses at slaughter". *Can. J. Vet. Res.* 75, 106-111.

Thanawongnuwech R., Brown, G.B., Halbur, P.G., Roth, J.A., Royer, R.L., Thacker, B.J. (2000). “Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced increase in susceptibility to Streptococcus suis infection”. Vet. Pathol. 37, 143-152.

Xiao Z., Batista, L., Dee, S., Halbur, P., Murtaugh, M.P. (2004). “The level of virus-specific T-cell and macrophage recruitment in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in pigs is independent of virus load”. J. Virol. 78, 5923-5933.

Zimmerman J., Benfield, D.A., Murtaugh, M.P., Osorio, F., Stevenson, G.W., Tottemorell, M. (2006). “Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus (porcine Arterivirus)” in: Straw B.E., Zimmerman J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 9th edition. Blackwell Publishing Professional, Ames, 387-417.

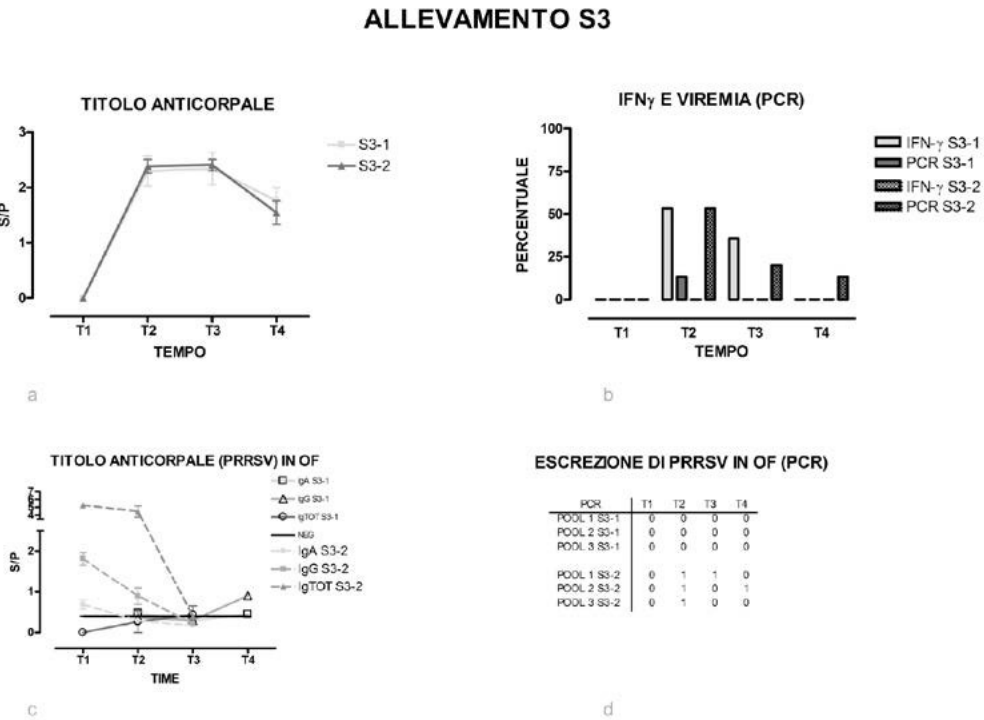


Figura 1: Risultati di laboratorio ottenuti nell’azienda S3. Siero, sangue intero eparinato e campioni di fluidi orali sono stati raccolti da due gruppi di 15 scrofette ciascuno (S3-1 e S3-2). I quattro pannelli raffigurano, rispettivamente, la risposta anticorpale sierica a PRRSV (in alto a sinistra), le risposte anticorpali IgG e IgA nei fluidi orali (in basso a sinistra), viremia PRRSV e risposta IFN-gamma (in alto a destra), escrezione di PRRSV in fluidi orali (in basso a destra), rispettivamente. L’escrezione di PRRSV nei fluidi orali è mostrata in termini di pool positivo (simbolo 1) e negativo (simbolo 0) in PCR, di 5 campioni ciascuno in entrambi i gruppi di scrofette. La prevalenza di positivi al saggio IFN-gamma in soggetti PRRSV-viremici e non-viremici risultava essere significativamente diversa secondo il test esatto di Fisher ($P < 0,001$).

Tabella 1: Allevamento stabile per PRRS S1: risultati di laboratorio

GRUPPO 1	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0	0,35	ND	0,92	0,76	0,86
Ab siero: positivi/totale	0/8	3/8	ND	8/8	7/8	8/8
Fluidi orali: media s/p IgA	0 (neg)	0,61 (pos)	ND	0,49 (pos)	0,87 (pos)	0,75 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	0,10 (neg)	1,83 (pos)	ND	1,04 (pos)	1,16 (pos)	1,06 (pos)
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	4/8	ND	ND	ND	0/8

GRUPPO 2	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0,01	0,08	0,93	1,11	1,03	ND
Ab siero: positivi/totale	0/8	1/8	8/8	8/8	8/8	ND
Fluidi orali: media s/p IgA	0,02 (neg)	0,21 (neg)	0,91 (pos)	0,53 (pos)	0,49 (pos)	ND
Fluidi orali: media s/p IgG	0,12 (neg)	0,23 (neg)	0,84 (pos)	1,09 (pos)	0,86 (pos)	ND
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	0/8	ND	ND	ND	4/8

GRUPPO 3	T1 (giorno 1)	T2 (giorno 49)	T3 (giorno 63)	T4 (giorno 77)	T5 (giorno 91)	T6 (giorno 105)
Ab siero: media s/p	0	0,05	0,11	0,89	0,65	0,75
Ab siero: positivi/totale	0/8	0/8	1/7	7/7	7/7	6/7
Fluidi orali: media s/p IgA	0 (neg)	0 (neg)	0.17 (neg)	0.07 (neg)	0.27 (neg)	0.8 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	0,04 (neg)	0,03 (neg)	0,28 (neg)	0,5 (pos)	1,0 (pos)	0,77 (pos)
Saggio IFN-g positivi/totale	ND	0/8	ND	ND	ND	2/7

Tre gruppi di scrofette sono stati introdotti nel settore della quarantena. Sono stati ispezionati clinicamente e sono stati effettuati prelievi ai tempi indicati. Pos: campione positivo. Neg: campione negativo. ND: non eseguito. La RT-PCR Real-time per il gene PRRSV ORF7 era sempre negativa sui campioni di siero e liquido orale (dati non mostrati).

Tabella 2: Allevamento instabile per PRRS I1: risultati di laboratorio

	Suini di 28 giorni di vita	Suini di 42 giorni di vita	Suini di 56 giorni di vita	Suini di 70 giorni di vita
Ab siero: media s/p	1,19	0,77	1,72	1,45
Ab siero: positivi/totale	8/8	5/8	8/8	7/8
Fluidi orali: media s/p IgA	2,38 (pos)	0,29 (neg)	0,78 (pos)	0,49 (pos)
Fluidi orali: media s/p IgG	3,53 (pos)	1,98 (pos)	2,43	0,75 (pos)
Saggio IFN-g: positivi/totale	6/8	0/8	1/8	0/8
RT-PCR real time siero	pos	pos	pos	pos
RT-PCR real time fluidi orali	pos	pos	pos	neg

Uno studio trasversale è stato condotto in un allevamento instabile per PRRS in presenza sia di malattia respiratoria che riproduttiva. Due pool di 4 campioni di siero ciascuno sono stati analizzati mediante RT-PCR real-time per il gene PRRSV ORF7. Pos: campione positivo. Neg: campione negativo.

INDAGINE SULLE ALTERAZIONI ANATOMO-PATOLOGICHE DELLE CAVITÀ NASALI NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI ITALIANI

SURVEY ON GROSS PATHOLOGY LESIONS OF THE NASAL CAVITY IN THE ITALIAN SWINE FARMS

POLLONI A.¹, CANDOTTI P.², OSTANELLO F.³, LEOTTI G.⁴

¹ Libero professionista – Cremona, ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna – Brescia, ³ Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna, ⁴ Boehringer Ingelheim Italia AH - Milano

Parole chiave: Rinite atrofica; *Pasteurella multocida*; *Bordetella bronchiseptica*
Key Words: Atrophic rhinitis; *Pasteurella multocida*; *Bordetella bronchiseptica*

Riassunto: La rinite atrofica è una patologia multifattoriale diffusa nell'allevamento intensivo del suino. Scopo del lavoro è valutare, tramite un appropriato percorso diagnostico, la gravità delle lesioni dei turbinati e del setto nasale in modo da poterle classificare in: 1) anatomicamente normali; 2) di lieve entità; 3) di media entità o 4) di grave entità, secondo uno schema di score (punteggio) predefinito. Per ogni suino identificato in ciascuna delle 20 aziende prese in esame è stato effettuato e fotografato il taglio trasversale del naso in corrispondenza del primo o del secondo premolare superiore. La fotografia è stata scattata utilizzando uno smartphone, strumento comunemente utilizzato dal professionista e in grado di trasmettere l'immagine a distanza. L'osservazione delle fotografie scattate ha permesso l'attribuzione di un valore di score da parte di un unico esperto, in modo da ridurre al minimo la variabilità del giudizio. Inoltre, per ogni azienda e per ogni suino, sono stati raccolti dei dati e osservazioni sui singoli gruppi di animali secondo una scheda anamnestica fornita ai veterinari. Il 14,7% dei nasi valutati non presentava alterazioni (score 0), il 52,9% presentava alterazioni di lieve entità (score tra 1 e 7), il 23,5% presentava alterazioni di media entità (score tra 8 e 14) e l'8,8% alterazioni gravi (score >15). È stata osservata una differenza statisticamente significativa (p<0,05) tra la media dei punteggi dei turbinati superiori ed inferiori con questi ultimi che presentano un più alto valore medio degli score.

Abstract: Atrophic rhinitis is a multifactorial disease widespread through pig farms. The aim of this field study is to assess the injuries of the meatus and the nasal septum according to a score pattern. For every pig identified in each of the 20 farms was performed a cross cut of the snout at the level of the first or the second upper premolar and photographs were taken. The photograph was taken using a smartphone, a tool commonly used by the professional and able to send image. The photographs were scored by a single expert in order to minimize variability. In addition, for each farm and for each pig data and observations were collected according to the data sheet provided to the veterinarians. The 14.7% of the snout were pointed as 0 because they does not show alterations, the 52.9% has light alterations therefore with a score included between 1 and 7, 23.5% alterations of average entity therefore included between 8 and 14 points and 8.8% serious changes between 15 and 22 points. The statistical analysis shows that there is a statistically significant difference (p<0.05) between the mean of the upper and lower meatus scores with the latter having a greater degree of injury.

INTRODUZIONE

La rinite atrofica (RA) è una patologia ad eziologia multifattoriale endemica in molte aree con allevamento suino intensivo. I principali agenti patogeni responsabili della RA sono *Bordetella bronchiseptica* e *Pasteurella multocida*, che insieme ad altri fattori, prevalentemente di tipo ambientale, possono provocare l'instaurarsi della malattia con vari gradi di gravità.

B. bronchiseptica è un batterio gram negativo, aerobio, bastoncellare o coccoide dotato di flagelli peritrichi che venne riconosciuto come patogeno del tratto respiratorio dei mammiferi fin dal 1910 con il nome di *Bacillus bronchicanis* (5). In particolare, Switzer (13) dimostrò come da una coltura in purezza di *B. bronchiseptica* si potesse sperimentalmente indurre la rinite atrofica nel suino.

B. bronchiseptica si attacca all'epitelio respiratorio cigliato proliferando rapidamente e causando la paralisi delle ciglia attraverso la produzione di adenilato ciclasi che possiede anche attività anti fagocitaria. Il patogeno è in grado di produrre una tossina lipopolisaccaridica (dermonecrotic toxin - DTN) che impedisce la deposizione di Ca^{2+} nei turbinati (6), manifestazione più frequente e grave nei suinetti in accrescimento in cui l'attività osteoclastica è maggiore.

B. bronchiseptica si trasmette primariamente attraverso l'aerosol e il principale serbatoio di infezione è rappresentato dalle scrofe e scrofette in sala parto; la trasmissione tra suinetti dopo lo svezzamento è esacerbata dal rimescolamento delle nidiati (2).

La tossina prodotta provoca lesioni caratterizzate da necrosi, emorragie, accumulo di neutrofili e, alcune volte, fibrosi. L'accumulo di muco e l'esposizione della sottomucosa può favorire la colonizzazione da parte di altri batteri. In particolare, la predisposizione alla sovrainfezione da parte di *Pasteurella multocida*, sarebbe dovuta all'abilità di questo patogeno, ed in particolar modo di quelli appartenenti sierotipo D, di interagire con domini leganti eparina di *B. bronchiseptica* (9).

P. multocida è un bastoncello o cocco gram negativo, anaerobio facoltativo, immobile, isolato in tutto il mondo dal tratto respiratorio e dall'intestino di molti mammiferi compresi quelli acquatici. Può causare patologie sia acute che croniche in una notevole varietà di ospiti; nell'uomo è frequentemente associata ad infezioni da graffio e da morso.

Nei suini si isola prevalentemente dalle cavità nasali e dalle cripte tonsillari anche di soggetti clinicamente sani in tutto il mondo, con prevalenza dei sierotipi capsulari A preferenzialmente nel polmone e D, localizzato prevalentemente a livello nasale ed è agente eziologico della rinite atrofica progressiva (7,14). La trasmissione aerogena sembrerebbe essere poco probabile poiché negli allevamenti da ingrasso con patologia in atto si è stati in grado di isolare solo un basso numero di UFC da aria ambientale (1), mentre sembrerebbe essere decisivo, per il diffondersi della patologia, il contatto naso-naso.

In seguito alla colonizzazione epiteliale da parte di *B. bronchiseptica*, *P. multocida* elabora una tossina proteica che provoca progressivo accorciamento/deviazione del naso e atrofia irreversibile dei turbinati. I soggetti che si infettano nelle prime settimane di vita sono quelli che sviluppano la forma più grave della patologia, mentre se l'infezione avviene dopo la sedicesima settimana di vita le lesioni sono meno gravi (11).

Nel sistema di allevamento italiano la patologia è endemica nel 25-30% degli allevamenti, con presenza di forme sub-cliniche evidenziate da osservazioni fatte in sede di macellazione (10).

La rilevanza economica della patologia è notevole poiché l'incremento ponderale medio giornaliero può essere compromesso sia in ingrasso che in svezzamento, rispettivamente del 6% e del 13,3% con picchi oltre l'11% sull'intero ciclo produttivo se vi si associano problemi respiratori (4).

Scopo del lavoro è stato quello di valutare prevalenza e gravità delle lesioni ai turbinati e setti nasali di suini rinvenuti morti in azienda; la gravità è stata valutata attraverso l'attribuzione di uno score (punteggio) alle lesioni evidenziate a livello dei turbinati e del setto nasale dopo aver effettuato una sezione trasversale del naso.

Questo lavoro di campo non ha preso in considerazione la ricerca batteriologica degli agenti eziologici di RA, progressiva e non progressiva, in quanto gli obiettivi erano i seguenti: a) fornire una valutazione generale delle lesioni anatomo-patologiche di RA riscontrabili in allevamenti non sottoposti da tempo ad una profilassi vaccinale, oppure a piani di vaccinazione non completi; b) stimare l'attenzione dei veterinari italiani nei confronti di questa malattia percepita spesso ormai come quasi scomparsa nei moderni allevamenti; c) sperimentare l'utilizzazione della tecnologia per immagini, ormai a disposizione di tutti, nel migliorare la qualità dei percorsi diagnostici per RA.

MATERIALI E METODI

Aziende e animali

Per lo svolgimento del lavoro sono state selezionate 20 aziende suinicole italiane che non vaccinavano, o vaccinavano solo parzialmente, contro la RA da almeno un anno.

Per ogni azienda sono stati presi in considerazione almeno 3-5 soggetti, con peso tra i 20 e 180 Kg, rinvenuti morti dal personale aziendale. I suini sono stati conservati in cella frigorifera prima dell'esame autoptico oppure, compatibilmente con le tempistiche e la temperatura in ambiente esterno, fino all'arrivo del veterinario. Il veterinario ha compilato una scheda identificativa per ogni carcassa e ha proceduto con l'esame anatomo-patologico. Per ogni suino identificato è stato effettuato un taglio trasversale del naso, eseguito in corrispondenza del secondo premolare superiore, oppure del primo premolare superiore nel caso si trattasse di soggetti fino a 4-6 mesi d'età. In questa fase, il veterinario si è avvalso di un coltello, oppure una lama da bisturi, per praticare l'incisione cutanea che funge da guida per il seghetto da ferro utilizzato per sezionare le ossa nasali a tutto spessore. Ogni naso così sezionato è stato fotografato cercando di porre l'obiettivo fotografico frontalmente alla sezione di taglio.

L'esame anatomo-patologico poteva eventualmente proseguire con l'apertura del torace e l'esposizione dei polmoni in modo da poter valutare visivamente eventuali lesioni macroscopiche.

Attribuzione dello score alle sezioni ottenute

Le sezioni di naso ottenute sono state fotografate e, alle lesioni eventualmente presenti, è stato attribuito uno score secondo una scala con valori complessivi variabili da 0 a 22 e che, per ogni turbinato, prevedeva l'utilizzazione della seguente griglia di punteggio:

- 0: normale, il turbinato riempie il meato;
- 1: leggera deviazione dal normale; nessuna atrofia apparente, leggera deviazione dalla normalità anatomica;
- 2: leggera atrofia con spazio di 6 mm tra turbinato e meato, leggera modificazione degenerativa del turbinato;
- 3: modificazioni moderate con spazi fino a 7 mm e degenerazioni moderate dei turbinati;
- 4: modificazioni da moderate a gravi con spazi > 8 mm e alterazioni degenerative da moderate a gravi con turbinato friabile;
- 5: modificazioni gravi con perdita totale del turbinato.

Anche al setto nasale sono stati attribuiti dei punteggi secondo il seguente schema:

- 0: normale;
- 1: deviazione moderata;
- 2: deviazione grave.

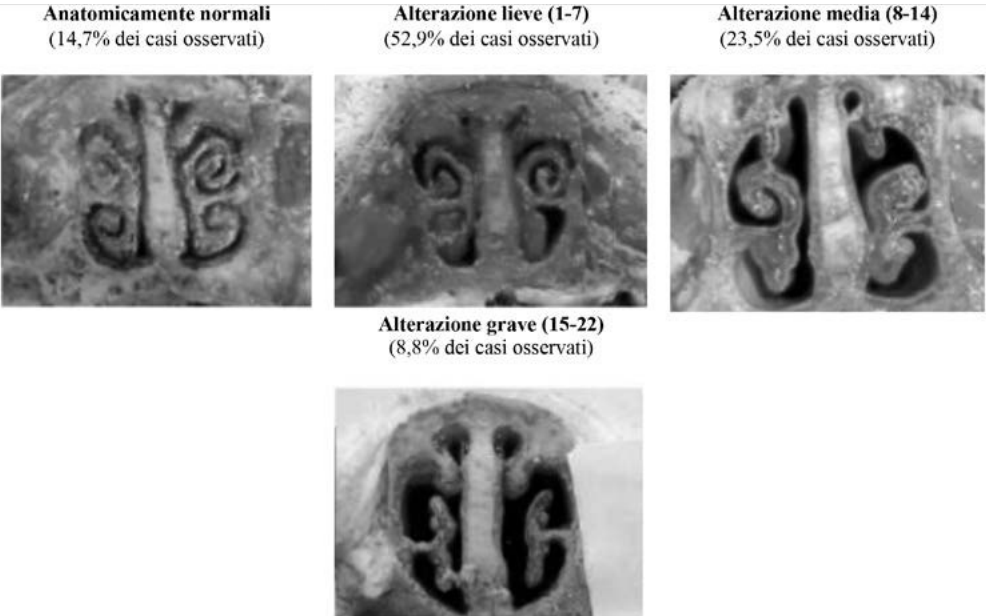
Il valore complessivo dello score si ottiene quindi sommando i punteggi attribuiti a ciascuno dei 4 turbinati (valore massimo: 20) a quello attribuito alle lesioni a carico del setto nasale (valore massimo: 2).

Successivamente si è deciso di suddividere per classi di gravità le lesioni valutate secondo il seguente schema:

- 0 nessuna lesione (anatomicamente normali);
- 1-7 alterazione lieve;
- 8-14 alterazione media;
- 15-22 alterazione grave.

La Figura 1 riporta alcuni esempi di attribuzione dello score delle lesioni.

Figura 1. Esempio di immagini a cui è stato attribuito uno score suddiviso per classi di lesioni
Figure 1. Example of images scored and divided into classes of lesions



Analisi statistica

Preliminarmente sono stati calcolati, per ciascuna azienda, gli indici descrittivi sintetici (valore minimo, valore massimo, media e mediana) dei punteggi attribuiti a ciascun turbinato ed al setto. Successivamente è stata calcolata la somma degli score attribuiti ai turbinati superiori ed inferiori e quella complessiva (comprendente gli score riferiti ai setti nasali).

Previa verifica della normalità della distribuzione campionaria, realizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov, sono state verificate eventuali differenze tra: a) la somma dei punteggi dei turbinati superiori e di quelli inferiori nelle aziende esaminate; b) la prevalenza aziendale di animali con lesioni; c) la distribuzione delle classi di gravità delle lesioni.

I dati quantitativi sono stati analizzati utilizzando il test di Mann-Whitney mentre per i dati qualitativi è stato utilizzato il test chi-quadrato. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS ver. 23.

RISULTATI

Complessivamente sono state inviate, all’esperto responsabile dell’attribuzione dello score, 103 immagini di sezione di naso.

Per 35 immagini inviate non è stato possibile eseguire la valutazione della gravità delle lesioni e attribuire uno score, in conseguenza della scarsa qualità delle foto e/o di errori nella fase di esecuzione della sezione del naso. Lo score è stato quindi attribuito a 68 nasi (corrispondenti al 66% delle immagini ricevute dall’esperto): il 14,7% di queste 68 immagini è stato considerato anatomicamente normale, mentre il restante 85,2% presentava lesioni di RA.

La Figura 2 riporta la distribuzione di frequenza delle diverse classi di gravità delle lesioni dei 68 animali per i quali è stato possibile eseguire una valutazione qualitativa. Circa il 53% dei soggetti ha presentato alterazioni giudicate “lievi” (score 1-7). In 6 soggetti (8,8%) sono state evidenziate alterazioni gravi (score 15-22).

Figura 2. Distribuzione delle frequenze per classi di lesioni di RA (68 immagini esaminate)
Figure 2. Distribution of frequencies for classes of RA lesions of RA (68 images scored)

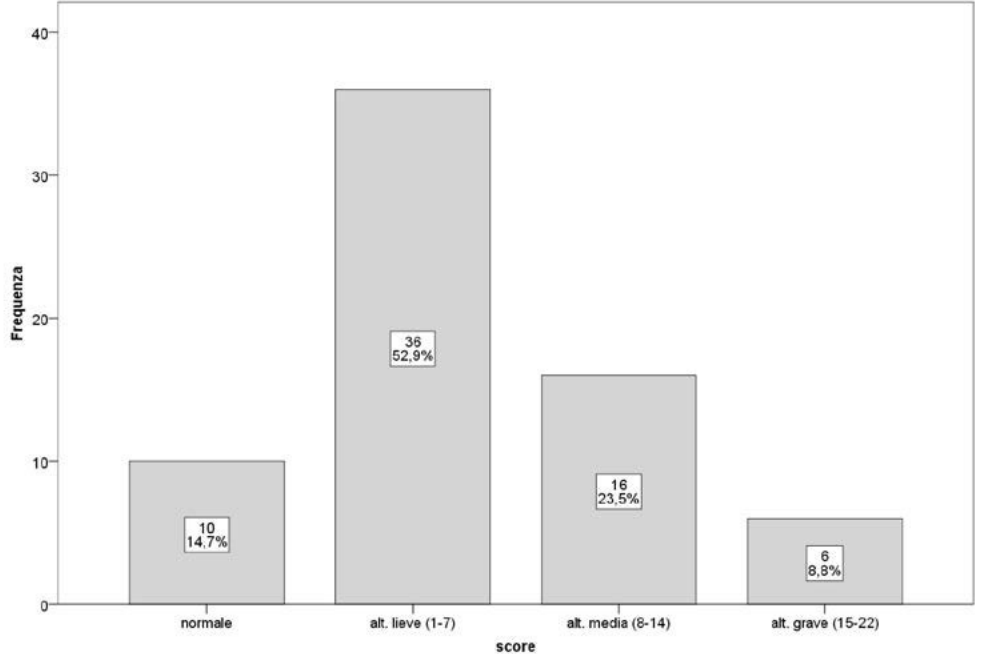
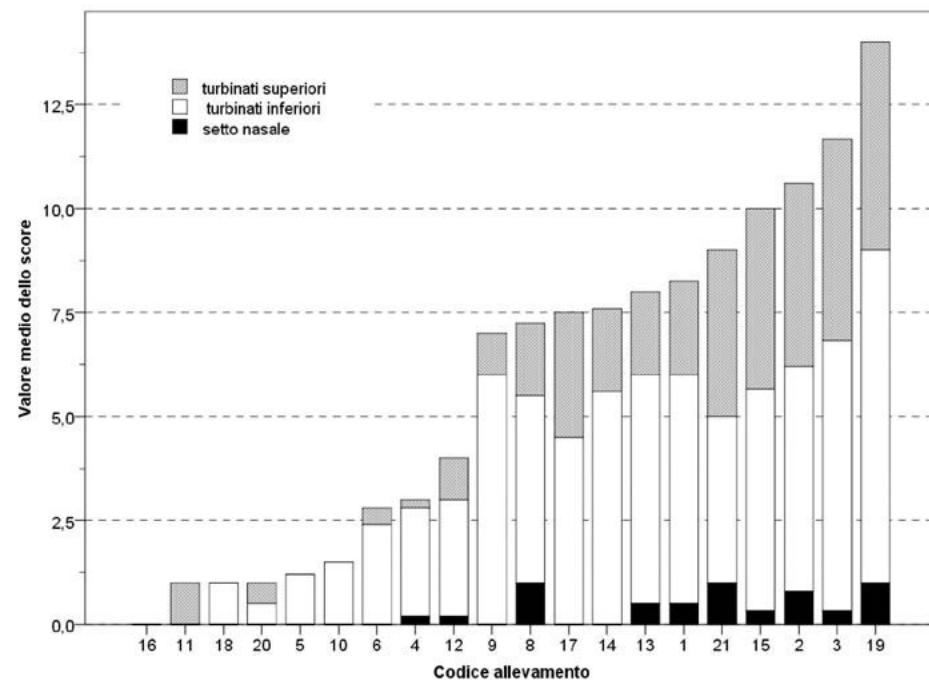


Figura 3. Media dei punteggi delle lesioni attribuiti ai turbinati superiori, inferiori e al setto nasale (intervallo di valori: 0-22), per ogni azienda, ordinate per valore crescente di score.

Figure 3. Average scores of lesions in upper and lower turbinates and nasal septum (range: 0-22), divided by farm in increasing order.



È stata messa in evidenza una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) tra i punteggi dei turbinati superiori e inferiori; questi ultimi hanno presentato valori di score (e quindi gravità delle lesioni) mediamente più elevati rispetto ai turbinati superiori. Questa differenza può essere visivamente valutata anche nella Figura 3, che riporta la media dei valori di score attribuiti ai turbinati superiori, ai turbinati inferiori e al setto nasale degli animali esaminati provenienti da ciascuno dei 20 allevamenti considerati. E' evidente una notevole differenza dei valori medi dello score nelle 20 aziende esaminate, con valori che vanno da un minimo di 0 (azienda n. 16) ad un massimo di 14 (azienda n. 19).

E' stato inoltre evidenziata una differenza statisticamente significativa ($p < 0,05$) sia per quanto riguarda la prevalenza aziendale di animali con lesioni sia per quanto riguarda la distribuzione delle classi di gravità delle lesioni.

DISCUSSIONE

Complessivamente, i risultati ottenuti indicano una prevalenza di animali con lesioni riconducibili a RA pari a circa l'85% degli esaminati. Questa elevata prevalenza potrebbe essere giustificata dal fatto che le aziende da cui provenivano gli animali non applicavano piani di profilassi vaccinale nei confronti della RA, oppure vaccinavano solo certe categorie di animali e con un protocollo non ben definito.

Tuttavia, la maggioranza degli animali (52,9%) presentava alterazioni di lieve entità (score 1-7) e solo in 6 soggetti sono state riscontrate alterazioni gravi (score 15-22).

La differenza statisticamente significativa che è stata osservata sia per quanto riguarda la

prevalenza aziendale di animali con alterazioni riconducibili a RA, sia per quanto riguarda la distribuzione delle classi di gravità delle lesioni, è probabilmente da ricondurre a possibili differenze ambientali, alla diversa età degli animali esaminati e alla scarsa numerosità di animali esaminati per azienda.

La differenza statisticamente significativa che è stata riscontrata tra la somma del punteggio dei turbinati superiori e quella degli inferiori (che presentano score più elevati), potrebbe trovare giustificazione nel fatto che la distribuzione delle cellule caliciformi non è omogenea all'interno dei meati. Infatti, come dimostrato da Larochelle (8), vi è aumento di densità delle cellule caliciformi in senso rostrocaudale all'interno del naso con le densità maggiori a livello di meato ventrale e setto. Queste cellule producono sialomucine e sulfomucine con una predominanza delle sialomucine tra il primo e il quattordicesimo giorno di vita del suinetto. L'affinità dei patogeni è maggiore nei confronti dei glicoconjugati sialici e quindi si spiegherebbe la maggior suscettibilità alle infezioni nei suinetti nelle primissime fasi della vita, in particolare a livello di turbinato ventrale. I batteri patogeni sono in grado di utilizzare l'acido sialico in almeno due modi differenti: possono ricoprirsi di acido sialico per resistere ai componenti della risposta immunitaria dell'ospite, oppure possono usarlo come sostanza nutritiva. L'acido sialico è o sintetizzato *ex novo* da questi batteri o ricavato direttamente dall'ospite. In particolare *Pasteurella multocida* è in grado di incorporare nella membrana l'acido sialico prodotto dall'ospite per eludere le difese immunitarie (12).

Anche in condizioni di campo, il sospetto clinico della presenza in allevamento di problemi sanitari legati alla RA, può essere facilmente confermato mediante tecniche estremamente semplici quali il taglio del naso. Questa pratica consente di evidenziare con certezza la presenza di lesioni anatomiche proprie della RA, consentendo una valutazione più accurata della reale prevalenza aziendale. E' noto infatti che sintomi clinici e/o alterazioni anatomiche riconducibili a RA sono evidenziabili, in vivo, solo in un numero esiguo di soggetti che rappresentano la "punta dell'iceberg".

Questo protocollo diagnostico per RA prevede l'utilizzo di strumenti a bassissimo costo e reperibili anche all'interno dell'allevamento stesso: sono sufficienti un coltello e un seghetto che monti una lama adatta al ferro e una fotocamera che, con la ampia diffusione attuale degli smartphone, è costantemente disponibile e permette di scattare fotografie di ottima qualità, che possono essere osservate anche successivamente, archiviate o inviate a personale esperto. L'utilizzo dello smartphone può facilitare il lavoro del veterinario aziendale riducendo le tempistiche di invio ad esperti dei dati raccolti ed il conseguente confronto delle proprie osservazioni con sistemi standardizzati di valutazione della gravità delle lesioni.

CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine di campo consentono di avanzare alcune considerazioni: a) è verosimile ritenere che la RA sia un problema che interessa una percentuale consistente di aziende italiane e che la prevalenza di animali con lesioni anatomiche possa essere relativamente elevata; b) strumenti di valutazione come quelli proposti sono di costo contenuto, facilmente realizzabili dal veterinario aziendale a condizione che il taglio del naso e la fotografia delle lesioni vengano effettuati in maniera corretta.

I dati di prevalenza/gravità delle lesioni potrebbero inoltre essere utilizzati per l'individuazione dei fattori di rischio aziendali, analogamente a quanto è stato già effettuato in passato per altre patologie quali, ad esempio, la polmonite enzootica.

L'accertamento sistematico della prevalenza di animali con lesioni riconducibili a RA e la quantificazione, attraverso mezzi molto semplici quali lo score, della gravità delle lesioni è un presupposto importante per la valutazione della prevalenza e della gravità del problema, per la corretta implementazione di misure di profilassi e per la valutazione dell'efficacia

della vaccinazione. I danni ai turbinati predispongono all'instaurarsi di patologie delle vie respiratorie profonde che, nei casi più gravi, possono portare ad un riduzione dell'indice di incremento ponderale fino al 22% (3) e favorire anche un incremento dell'uso di antibiotici per la terapia di tale problematica, tale da indurre le autorità sanitarie a consigliare la vaccinazione contro la RA una volta emessa la diagnosi (15).

Ringraziamenti

Si ringraziano i 17 colleghi che hanno attivamente aderito a questa indagine di campo.

BIBLIOGRAFIA

1. Baekbo, P., & Nielsen, J. P. (1988) Airborne Pasteurella multocida in pig fattening units. *Proceedings of the 10th International Pig Veterinary Society, Rio de Janeiro, Brazil*, 51.
2. Brockmeier S. L., Register K.B., Nicholson T.L., Loving C.L. (2012) Bordetellosis in Zimmermann, J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W. (2012) Diseases of swine 10 TH Edition. Wiley Blackwell 670-679.
3. De Jong M.F. (1985) "AR in pigs", Tesi, Università di Utrecht.
4. Donko, T., Kovács, M., & Magyar, T. (2005) Association of growth performance with atrophic rhinitis and pneumonia detected at slaughter in a conventional pig herd in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(3), 287-298.
5. Ferry, N. S. (1910) A preliminary report of the bacterial findings in canine distemper. *Am. Vet. Rev.* 37:499-504.
6. Harris, D. L., & Switzer, W. P. (1968) Turbinate atrophy in young pigs exposed to Bordetella bronchiseptica, Pasteurella multocida, and combined inoculum. *American journal of veterinary research*, 29(4), 777.
7. Hoie, S., Falk, K., & Lium, B. M. (1991) An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. Bacteriological findings in chronic pneumonic lesions. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 32(3), 395-402.
8. Larochelle, R., & Martineau Doizé, B. (1991) Distribution and histochemical characterization of goblet cells in the nasal cavity of piglets. *Developmental Dynamics*, 191(1), 103-111.
9. Menozzi, F. D., Mutombo, R., Renauld, G., Gantiez, C., Hannah, J. H., Leininger, E., Brennan, M.J., Loch, C. (1994) Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of Bordetella pertussis. *Infection and immunity*, 62(3), 769-778.
10. Pozzi P.; J.C.Baars (1993) Rinite Atrofica: reperti di macellazione, *Summa Veterinaria* 1;19.
11. Rutter, J. M., & Luther, P. D. (1984) Cell culture assay for toxigenic Pasteurella multocida from atrophic rhinitis of pigs. *The Veterinary record*, 114(16), 393-396.
12. Severi, E., Hood, D. W., & Thomas, G. H. (2007) Sialic acid utilization by bacterial pathogens. *Microbiology*, 153(9), 2817-2822.
13. Switzer, W. P. (1956) Studies on infectious atrophic rhinitis V. Concept that several agents may cause turbinate atrophy. *American Journal of Veterinary Research*, 17:478-484.
14. Varga, Z., Sellyei, B., & Magyar, T. (2007) Phenotypic and genotypic characterisation of Pasteurella multocida strains isolated from pigs in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 55(4), 425-434.
15. Ministero della sanità- Manuale di biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia (2012), 33.

VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DELLA DURATA DEL TRATTAMENTO CON ALTRENOGEST SULLA PORTATA AL PARTO E SULLE DIMENSIONI DELLE COVATE NELLE SCROFETTE

EFFECT OF DURATION OF ALTRENOGEST TREATMENT ON FARROWING RATE AND LITTER SIZE OF GILTS

ROMANO G.¹, DE RENSIS F.², SCOLLO A.¹, MAZZONI C.¹

¹ Suivet, Via Martiri della Bettola 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italia; ² Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, 43121 Parma, Italia;

Parole chiave: altrenogest, portata al parto, dimensioni della covata

Key words: altrenogest, farrowing rate, litter size

Riassunto: L'obiettivo del presente studio è stato di valutare, durante i diversi periodi dell'anno, l'azione che l'altrenogest (ALT), somministrato per via orale, esercita sulla fertilità delle scrofette, mettendo a confronto due differenti durate di trattamento. Per 12 mesi le scrofette, presumibilmente ciclanti, sono state sincronizzate mediante l'impiego di 15 mg/gg di ALT per 18 giorni (gruppo ALT-18; n: 268) o per 14 giorni (gruppo ALT-14; n: 153), mentre 275 scrofette non sono state trattate (gruppo Controllo). Il numero di scrofette che ha manifestato l'estro entro 7 giorni dalla fine del trattamento è stato inferiore nel gruppo ALT-14 rispetto al gruppo ALT-18 (79.1% vs 88.8%; $P < 0.05$). Anche la portata al parto è stata inferiore ($P < 0.05$) nel gruppo ALT-14 (81%, 91% e 92% per ALT-14, ALT-18 e Controllo) e tale dato non sembra essere stato influenzato dal periodo dell'anno. Nel gruppo Controllo le dimensioni delle covate sono state simili al gruppo ALT-14, ad eccezione del periodo compreso tra Settembre e Novembre, in cui ha evidenziato covate di maggiori dimensioni (13.6 ± 0.33 , 12.3 ± 0.65 e 12.7 ± 0.39 per Controllo, ALT-14 e ALT-18; $P < 0.05$); il gruppo ALT-18 ha avuto invece covate più grandi tra Gennaio ed Agosto. I dati estrapolati suggeriscono, quindi, la possibilità di ottenere una migliore sincronizzazione degli estri nelle scrofette adoperando un trattamento con ALT della durata di 18 giorni.

Abstract: The objective of the present study was to compare two common durations of altrenogest (ALT) feeding during different periods of the year on the fertility of gilts after ALT withdrawal. During a 12-month period, gilt replacements that were assumed to be cyclic were subjected to oestrus synchronisation with 15 mg/day ALT administered for 18 days (ALT-18; n = 268) or 14 days (ALT-14; n = 153) whereas 275 non-treated gilts served as controls. Fewer ALT-14 than ALT-18 gilts expressed oestrus by 7 days after last ALT treatment (79.1% vs 88.8%; $P < 0.05$). Farrowing rate was lower ($P < 0.05$) for ALT-14 than for the other groups (81%, 91% and 92% for ALT-14, ALT-18, and Control, respectively) but farrowing rates were not affected by time of year. Control litter sizes were not different from ALT-14 except during September to November when Control litter sizes were larger than either ALT treatments (13.6 ± 0.33 , 12.3 ± 0.65 and 12.7 ± 0.39 for Control, ALT-14 and ALT-18, respectively; $P < 0.05$). The ALT-18 gilts had larger litter sizes during January to August. The present data suggest that the appropriate duration of ALT feeding to synchronise oestrus in gilts is 18 days.

INTRODUZIONE

Negli allevamenti da riproduzione è comune avere gruppi di scrofette di cui non si conosce l'esatto andamento del ciclo estrale, proprio a causa dell'irregolarità con cui il ciclo stesso si manifesta in questa categoria di animali. Con l'introduzione del sistema a bande, si è ottenuto un grande miglioramento dell'efficienza riproduttiva, legato soprattutto alla possibilità di fecondare un numero sufficiente di animali (Dial *et al.* 1996). Se il fattore limitante risiede nel numero di scrofe in estro, allora la gestione delle scrofette, compresa la loro sincronizzazione, diventa di fondamentale importanza per assicurare un numero adeguato di animali in estro al fine di raggiungere i propri target di fecondazioni per banda.

L'unico prodotto commerciale attivo per via orale attualmente disponibile per la sincronizzazione degli estri nelle scrofette è l'altrenogest (ALT). I protocolli del trattamento standard con ALT variano in base al paese e prevedono la somministrazione per via orale di 15 o 20 mg/gg di ALT per un periodo di 14 o 18 giorni, dosaggio che è stato dimostrato non interferire con lo sviluppo follicolare nel post-svezzamento (van Leeuwen *et al.* 2010).

La somministrazione di ALT blocca la secrezione dell'ormone luteinico (LH) da parte della ghiandola pituitaria (Redmer and Day 1981); poiché questo ormone determina lo sviluppo dei follicoli ovarici da 4 mm fino all'ovulazione (Driancourt *et al.* 1995), l'inibizione della sua secrezione provoca l'interruzione dello sviluppo follicolare, ostacolando così la comparsa della manifestazione estrale. Con la sospensione della somministrazione di ALT, i profili secretori di LH si ristabiliscono e lo sviluppo follicolare riprende, determinando nel 96% delle scrofette la comparsa dell'estro nel giro di 4-7 giorni (Martinat-Botte *et al.* 1990). Oltre all'efficacia dimostrata nella sincronizzazione degli estri, l'utilizzo di ALT nelle scrofette ha comportato anche un aumento della portata al parto, probabilmente legato a una migliore gestione delle fecondazioni in base alla programmazione delle sincronizzazioni, e un aumento delle dimensioni delle covate (Martinat-Botte *et al.* 1990), legato invece ad un maggior tasso di ovulazione (Martinat-Botte *et al.* 1995).

Estate e inizio autunno sono i due periodi solitamente associati ad una riduzione della fertilità (per le recensioni, vedere Love *et al.* 1993; Peltoneimi e Virolainen 2006); è interessante notare come l'estate sia associata sia a un intervallo svezzamento-estrogeno che a un intervallo estrogeno-ovulazione più lungo (Balestra *et al.* 2004). L'ipotesi avanzata è che gli effetti della stagionalità sulla fertilità delle scrofette possano essere mitigati, almeno in parte, migliorando la sincronia tra estrogeno e ovulazione.

Attualmente non si conoscono dati riguardanti l'effetto del trattamento con ALT sulla comparsa dell'estro durante i diversi periodi dell'anno. Suscita però interesse il fatto che nei bovini e nei bufalini, i quali anch'essi soffrono di una riduzione della fertilità durante le stagioni calde, l'aggiunta di progesterone nel protocollo di sincronizzazione degli estri determini un aumento della percentuale di gravidanza (De Rensis *et al.* 2005).

L'obiettivo del presente studio è stato, quindi, di valutare l'effetto che diverse durate del trattamento con ALT determinano sulla sincronizzazione degli estri e sulla fertilità delle scrofette durante i diversi periodi dell'anno.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto presso un'azienda agricola suina sita nella provincia di Reggio Emilia, in Italia. Le scrofette, di genetica PIC (ibrido commerciale inglese), sono arrivate in azienda con cadenza tri-settimanale e suddivise in lotti da 8-19 animali, ciascuno dei quali avente un'età di 233 ± 3.6 giorni e un peso di 136 ± 7.6 kg. Sulla base dell'esperienza aziendale è stato dato per scontato che le scrofette di tale età e peso arrivassero in azienda

con almeno già un ciclo fatto.

Successivamente le scrofette sono state inserite in tre gruppi differenti, a cui sono stati assegnati i seguenti protocolli:

- Mangime trattato con 15 mg/gg di ALT per 18 giorni (gruppo ALT-18, $n=268$);
- Mangime trattato con 15 mg/gg di ALT per 14 giorni (gruppo ALT-14, $n=153$);
- Mangime privo di trattamenti con ALT (gruppo Controllo, $n=275$).

Ogni singola scrofa dei primi due gruppi ha ricevuto il trattamento con ALT insieme alla razione mattutina sempre alla stessa ora.

A partire dal giorno seguente la formazione dei gruppi, per il Controllo, o dall'ultima somministrazione di ALT, per i trattati, le scrofette sono state esposte alla presenza di un verro per un periodo di 15 minuti al giorno, in modo da favorire la comparsa dell'estro. Le scrofette trattate con ALT sono state fecondate artificialmente alla manifestazione del primo estro dopo l'ultimo pasto e nuovamente 24 h dopo utilizzando 3×10^9 spermatozoi in 80 ml di diluente per fecondazione. Le scrofette del gruppo Controllo sono state fecondate allo stesso modo ma alla manifestazione del loro estro naturale.

Durante la gestazione gli animali sono stati alimentati con 2.5 kg/gg di mangime commerciale suddiviso in due pasti, lasciando l'acqua a disposizione. L'anno è stato diviso in 4 periodi: Dicembre-Febbraio, Marzo-Maggio, Giugno-Agosto e Settembre-Novembre. Le sale adibite alla gestazione e all'allattamento sono state dotate di sistemi di raffrescamento tipo cooler e nei mesi compresi tra Giugno ed Agosto non si è mai superata la temperatura di 30°C. Inoltre, le scrofette sono state esposte ad un normale fotoperiodo. I dati registrati sono stati: la percentuale di estro nei 7 giorni successivi all'ultimo trattamento con ALT, l'intervallo ALT-estrogeno, la durata dell'estrogeno, la portata al parto e il numero totale dei suinetti nati.

Analisi statistiche

Il tasso di concepimento è stato analizzato in SPSS (IBM, New York, USA) come una variabile di risposta binaria (1 = gravida, 0 = non gravida) usando un modello lineare logistico generalizzato e servendosi di tre fattori: la stagione, il trattamento e l'interazione stagione-trattamento. Lo stesso modello è stato applicato al numero totale di suinetti nati.

RISULTATI

Il numero di scrofette appartenenti al gruppo ALT-18 (88.8%) che ha manifestato l'estro tra 3 e 7 giorni dalla fine del trattamento ($P < 0.05$) è stato superiore rispetto al numero osservato nel gruppo ALT-14 (79.1%). L'intervallo "fine del trattamento-estrogeno", comunque, non è stato differente tra i due gruppi trattati (5.2 ± 0.8 giorni vs 5.3 ± 1.2 per ALT-18 e ALT-14), come anche non ci sono state differenze significative nella durata dell'estrogeno (2.3 ± 0.2 , 2.0 ± 0.2 e 1.8 ± 0.2 giorni per ALT-18, ALT-14 e Controlli). La portata al parto non sembra essere stata influenzata dal periodo dell'anno, ma appare inferiore ($P < 0.05$) nel gruppo ALT-14 rispetto agli altri due gruppi (81%, 91% e 92% per ALT-14, ALT-18 e Controlli). Le dimensioni delle covate ($P < 0.01$), invece, hanno subito l'effetto dell'interazione tra il trattamento e il periodo dell'anno in cui è stato effettuato. Prendendo il gruppo Controllo come termine di paragone, le dimensioni delle covate sono state maggiori ($P < 0.05$) nel gruppo ALT-18, ad eccezione del periodo compreso tra Settembre e Novembre, in cui il gruppo Controllo ha avuto covate di maggiori dimensioni (Tabella 1). Il gruppo ALT-14, al contrario, ha avuto covate di dimensioni inferiori rispetto al gruppo ALT-18 oppure intermedie tra il gruppo Controllo e il gruppo ALT-18 (Tabella 1).

Tabella 1. Confronto tra i diversi gruppi in merito alle dimensioni delle covate in diversi periodi dell’anno.

Table 1. Litter sizes compared between the gilts pool during different periods of the year.

Periodo dell’anno	Controllo	ALT-14	ALT-18
Dic.-Feb.	12.8 ± 0.35a	12.2 ± 0.44a	14.5 ± 0.34b
Mar.-Mag.	12.2 ± 0.39a	12.7 ± 0.46ab	13.1 ± 0.38b
Giu.-Ago.	11.8 ± 0.33a	11.9 ± 0.51a	13.0 ± 0.33b
Set.-Nov.	13.6 ± 0.33a	12.3 ± 0.65b	12.7 ± 0.39b

La tabella mostra le dimensioni delle covate ottenute accoppiando le scrofette durante i periodi di Dicembre-Febrero (Dic.-Feb.), Marzo-Maggio (Mar.-Mag.), Giugno-Agosto (Giu.-Ago.) e Settembre-Novembre (Set.-Nov.). Le scrofette sono state sincronizzate utilizzando 15 mg/gg di ALT per 14 gg (gruppo ALT-14) o per 18 giorni (gruppo ALT-18) oppure non sono state trattate (gruppo Controllo). I dati con lettere minuscole diverse (a, b) sono differenti ($P < 0.05$).

In the table are represented litter sizes of gilts mated during December-February (Dec.-Feb.), March-May (Mar.-May.), June-August (June-Aug.) and September-November (Sept.-Nov.). The gilts were subjected to estrus synchronisation with 15 mg/day ALT administered for 14 days (ALT-14) or 18 days (ALT-18) or non-treated (Control). Data with different lowercase letters (a, b) are different ($P < 0.05$).

DISCUSSIONE

La diversa durata del trattamento con ALT non ha evidenziato alcun effetto sull’intervallo medio tra l’ultimo pasto e la rilevazione dell’estro; ciò supporta gli studi passati, sebbene tale intervallo sembrava essere più variabile nelle scrofette trattate per un periodo di 14 giorni (De Rensis *et al.* 2015).

Nel presente studio, un maggior numero di scrofette appartenenti al gruppo ALT-18, rispetto al gruppo ALT-14, ha manifestato l’estro entro 7 giorni dalla fine del trattamento, dato che si dimostra essere coerente con gli studi precedenti (Martinat-Botte *et al.* 1995; De Rensis *et al.* 2015). Lavori effettuati parecchi anni prima da Estienne e Harper (2002), inoltre, confermano che è minore il numero di scrofette trattate con ALT per 14 giorni che hanno manifestano l’estro entro 7 giorni dall’ultima somministrazione. Questi ultimi due autori hanno anche notato che la risposta di una scrofa ad un’iniezione di gonadotropina è inferiore se la scrofa stessa è stata sottoposta ad un trattamento con ALT della durata di 14 giorni anziché 18. Tutti questi elementi fanno presupporre che la somministrazione di ALT per un periodo di 14 giorni non possa essere sufficiente per un gruppo di scrofette che non cicla in maniera regolare, poiché qualche soggetto potrebbe avere un’attività luteinica residua al momento della sospensione del farmaco. Per poter ottenere migliori risultati di sincronizzazione, quindi, sarebbe meglio applicare un periodo di trattamento di almeno 18 giorni.

Precedenti studi sull’infertilità stagionale indicano una diminuzione della portata al parto durante il periodo estivo (Love *et al.* 1993; Peltoneimi and Virolainen 2006), a causa, almeno in parte, delle temperature elevate che riducono l’ingestione di alimento in lattazione. In questo studio, tuttavia, non è stato evidenziato alcun effetto del periodo dell’anno sulla portata al parto, probabilmente perché le temperature sono state mantenute sperimentalmente al di sotto dei 30°C grazie all’utilizzo dei sistemi di raffreddamento tipo cooler, non compromettendo in questo modo di molto l’assunzione di alimento in lattazione. Risulta interessante osservare

come la portata al parto sia inferiore nelle scrofette appartenenti al gruppo ALT-14, effetto documentato anche da Estienne and Harper (2002). Non si conosce il reale motivo di tale aspetto ma, considerando gli studi recenti e passati, è possibile ipotizzare che la causa risieda nella fecondazione di ovociti di bassa qualità. È plausibile che i follicoli di alcune scrofette regrediscono in seguito ad una soppressione dell’estro della durata di 14 giorni e poi tornino a svilupparsi dopo l’interruzione del trattamento; alcuni di questi follicoli, però, potrebbero contenere ovociti di minore qualità. Viceversa, un lungo periodo di soppressione potrebbe causare un’atresia dei follicoli con successiva crescita di nuovi follicoli che potrebbero contenere ovociti di buona qualità (van Leeuwen *et al.* 2015).

Fatta eccezione del periodo compreso tra Settembre e Novembre, le dimensioni delle covate sono state maggiori nel gruppo ALT-18 rispetto al gruppo Controllo. L’impatto del trattamento con ALT sulle dimensioni delle covate è da considerarsi variabile, con casi di incrementi (Martinat-Botte *et al.* 1990) e casi in cui non sono stati riscontrati effetti (Estienne and Harper 2002). Una maggiore dimensione delle covate è probabilmente da attribuirsi ad un miglioramento del tasso di ovulazione (Martinat Botte *et al.* 1995). Se fosse questo il principale o l’unico meccanismo per cui il trattamento con ALT è in grado di aumentare le dimensioni delle covate, allora l’effetto del farmaco sarà evidente solo nelle condizioni in cui il tasso di ovulazione rappresenti il fattore limitante per le dimensioni delle covate, cosa molto probabile per le scrofette.

CONCLUSIONI

I dati fino a qui considerati e i ragionamenti a essi correlati, ci indirizzano certamente verso l’utilizzo di un progestinico attivo per via orale (ALT), al fine di determinare la sincronizzazione degli estri in scrofette di cui si ignorano i tempi del ciclo estrale stesso. Si consiglia una durata del trattamento di 14 o di 18 giorni anche se, alla luce dell’attuale studio, sarebbe da preferire un periodo di 18 giorni, poi ché in grado di predisporre sia ad una migliore sincronizzazione degli estri che ad una migliore fertilità delle scrofette. Nonostante un trattamento di maggiore durata implichi inevitabilmente delle spese aggiuntive, il bilancio economico verrà sicuramente ristabilito da una maggiore produttività della scrofa.

Ringraziamenti:

Un sentito ringraziamento all’operato tecnico di Cristiano Vecchi, responsabile del reparto gestazione della scrofaia oggetto della prova.

BIBLIOGRAFIA

- Belstra B. A., Flowers W. L., See MT (2004) “Factors affecting temporal relationships between estrus and ovulation in commercial sow farms”. *Animal Reproduction Science* 84, 377–394.
- De Rensis F., Mazzoni C., Saleri R., Techakumphu M., Kirkwood R. N. (2015) “Effect of short (10- or 12-day) or standard (14- or 18-day) periods of estrus suppression with allyltrenbolone on estrus synchronization and fertility in pubertal gilts”. *Journal of Swine Health and Production* 23, 97-99.
- De Rensis F., Ronci G., Guarneri P., Nguyen B. X., Presicce G. A., Huszenicza G., Scaramuzzi R. J. (2005) “Conception rate after fixed time insemination following ovsynch protocol with and without progesterone supplementation in cyclic and non-cyclic Mediterranean Italian buffaloes (*Bubalus bubalis*)”. *Theriogenology* 63, 1824–1831.
- Dial G. D., Duangkaew C., King V., Rademacher C. (1996) “The influence of the gilt pool on weaned pig output”. *Proceeding of the AD Leman swine Conference* 23, 39–41.

- Driancourt M. A., Locatelli A., Prunier A. (1995) "Effects of gonadotrophin deprivation on follicular growth in gilts". *Reproduction, Nutrition, Development* 35, 663–673.
- Estienne M. J., Harper A. F. (2002) "Case study: Synchronization of estrus and fertility in gilts administered P.G.600 after treatment with Regumate for 14 or 18 days". *The Professional Animal Scientist* 18, 158–161.
- Love R. J., Evens G., Klupiec C. (1993) "Seasonal effects on fertility in gilts and sows". *Journal of Reproduction and Fertility* 48 (Suppl.), 191–206.
- Martinat-Botte F., Bariteau F., Forgorit Y., Macar C., Moreau A., Terqui M., Signoet J. P. (1990) "Control of oestrus in gilts – II. Synchronization of estrus with a progestogen altrenogest (Regumate): effect on fertility and litter size". *Animal Reproduction Science* 22, 227–233.
- Martinat-Botte F., Bariteau F., Forgorit Y., Macar C., Poirier P., Terqui M. (1995) "Synchronization of estrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival". *Animal Reproduction Science* 39, 267–274.
- Peltoneimi O. A. T., Virolainen J. V. (2006) "Seasonality of reproduction in gilts and sows". *Reproduction (Cambridge, England)* 62 (Suppl.), 205–218.
- Redmer D. A., Day B. N. (1981) "Estrus and ovulation in gilts fed a synthetic progestogen". *Theriogenology* 16, 195–199.
- van Leeuwen J. J., Martens M. R., Jourquin J., Driancourt M. A., Wagner A., Kemp B., Soede N. M. (2015) "Follicle size and reproductive hormone profiles during a post-weaning altrenogest treatment in primiparous sows". *Reproduction, Fertility and Development* 27, 304–312.
- van Leeuwen J. J., Williams S. I., Kemp B., Soede N. M. (2010) "Post-weaning altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicle development and consequences for early pregnancy". *Animal Reproduction Science* 119, 258–264.

EVOLUZIONE PRODUTTIVA AZIENDALE DAL 2012 AL 2016: MONITORAGGIO STATISTICO TRAMITE IL PROGETTO REPROPANEL

COMPANY PRODUCTION EVOLUTION FROM 2012 TO 2016: STATISTICAL MONITORING THROUGH THE REPROPANEL PROJECT

TONON F.¹, ROMANO G.¹, SCOLLO A.¹, CASAPPA P.², MAZZONI C.¹

¹ Suivet, Via Martiri della Bettola 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italia; ² Ceva Salute Animale

Parole chiave: Raccolta dati, dati produttivi, scrofe

Key words: Data collection, productive data, sows

Riassunto: Il progetto Repropanel nasce come strumento per andare incontro alle esigenze dell'allevatore, che spesso non dispone del tempo necessario per analizzare i propri dati aziendali. Viene infatti proposto un modo semplice ed efficace per visualizzare, sotto forma di grafici e tabelle, la produttività aziendale nel corso degli anni. È stato quindi ideato un motore di ricerca online in grado di fornire, in poco tempo, tutte le informazioni desiderate dall'allevatore, con la possibilità di scaricarle o stamparle. Ciò è fattibile solo per quegli allevamenti che, tramite l'intercessione del proprio veterinario aziendale, periodicamente forniscono al Repropanel i dati necessari alla realizzazione dello scopo. I dati sono facilmente estrapolabili dai software aziendali (es: Isaporc, HPA).

Gli allevamenti di tutta Italia, qualsiasi sia la loro dimensione, possono entrare a far parte del Repropanel facendone semplice richiesta all'interno del banner dedicato del sito della Suivet (www.suivet.it); in questo modo gli allevatori potranno usufruire dei servizi del programma, che consente di confrontare l'andamento produttivo del proprio allevamento con l'andamento medio ricavato dagli allevamenti aderenti al progetto il tutto gestito nel più rigoroso anonimato. Sono 18 i parametri produttivi presi in considerazione, di cui 10 ricavati dal programma aziendale, ed 8 elaborati direttamente dal Repropanel partendo dai primi.

In questo articolo è stata messa in evidenza la media di tutti i parametri raccolti, a partire da un campione di 57.300 scrofe facenti riferimento al periodo compreso tra il 2012 e il 2016.

Abstract: The Repropanel project was born like a tool of meeting the needs of breeders, who often do not have enough time to analyze his data company. It is proposed a simple and effective way to visualize, in the form of graphs and tables, the farm productivity over the years. An online search engine was designed to provide, in a short time, all the information desired by breeders, with the possibility of downloading or printing them. This is only feasible for those farmers which, through the intercession of their veterinarian, periodically provide the Repropanel with the necessary data. Data are easily extrapolated from farm software (e.g.: Isaporc, HPA).

All the farms of our country, whatever their size, can become part of the Repropanel project making a simple request within the dedicated banner of the web site of Suivet snc (www.suivet.it); In this way the breeders will be able to use the services of the program, which allows to compare the production performances of their farm with the average trend obtained from the others participating farms data. Everything is managed in the most rigorous anonymity.

There are 18 production parameters considered, 10 of which are derived from the farm program, and 8 processed directly by the Repropanel starting from the previous ones.

This article highlighted the average of all the parameters collected, starting from a sample of 57,300 sows referring to the period from 2012 to 2016.

INTRODUZIONE

“Nell’allevamento suinicolo industriale, la disponibilità dei dati ed una loro corretta lettura sono alla base sia delle valutazioni che delle scelte necessarie per mantenere o incrementare le performance aziendali. Tali dati devono essere omogenei e dotati di valori di riferimento che consentano di stabilire se il risultato conseguito è oggettivamente da ritenere positivo o negativo e quali azioni correttive possono essere intraprese per ottenere un risultato in linea con le attese e, forse ancora più importante, che consenta all’azienda di esplicitare al massimo le proprie potenzialità. È ovvio che una tale mole di informazioni debba rispondere ad alcune caratteristiche: l’omogeneità nella raccolta, la condivisione delle definizioni applicate per indicare il parametro analizzato e strumenti che si basino (quanto più possibile) su elementi oggettivi” (tratto dal “Glossario di Riproduzione Suina”, CEVA).

Uno scrittore americano esperto in metodi di studio, Kerlinger (2000), scrive, in merito alla “Content Analysis” (Analisi del Contenuto) che oggi rappresenta uno degli strumenti più utilizzati dai ricercatori per ricavare dati da documenti ipertestuali, che si tratta di *un metodo di studio e di analisi sistematico, oggettivo e quantitativo, avente lo scopo di misurare determinate variabili*. Tale definizione può essere adattata anche all’analisi statistica che risiede alla base del Repropanel, seppur in termini diversi, poiché implica tre concetti di fondamentale importanza. L’analisi statistica, infatti, deve essere *sistematica*, ovvero tutti i dati devono essere ricavati, gestiti e analizzati in ugual modo, mantenendo sempre lo stesso *modus operandi*; inoltre deve essere un’analisi di tipo *oggettivo* e ciò diventa possibile solo nel momento in cui vengono chiarite sia le definizioni utilizzate che i criteri di categorizzazione impiegati (es: media, 25% superiore, 25% inferiore). Infine, l’analisi statistica è bene che sia *quantitativa*: più sono i dati relativi ad uno specifico parametro più è possibile che il risultato finale sia realistico; riproposto nel Repropanel, quest’ultimo concetto vorrebbe dire che più sono gli allevamenti aderenti al progetto più sarà possibile avvicinarsi all’effettiva media nazionale di ogni parametro.

MATERIALI E METODI

Il progetto Repropanel conta, dal 2012 ad oggi, la partecipazione di 48 allevamenti, per un totale di circa 57.300 scrofe. Il programma, a cui è possibile accedere tramite il sito <https://servizi.suivet.it/repropanel>, contiene dati che vengono aggiornati con cadenza trimestrale, tenendo conto che la raccolta di un trimestre può essere effettuata passati 6 mesi dal termine dello stesso (per esempio i dati del 1° trimestre, Gennaio-Febbraio-Marzo, possono essere raccolti a partire da Settembre). La raccolta viene eseguita partendo dai software già presenti in azienda (Isaporc, HPA, Farmer e FARM), e prevede la compilazione di una semplice scheda riepilogativa.

Gli allevamenti aderenti al progetto possiedono da meno di 500 scrofe a più di 2500 e, per semplicità, le dimensioni delle scrofaie sono state suddivise in quattro categorie: 0-500, 501-1500, 1501-2500, > 2500. Le principali regioni da cui derivano i dati sono Veneto, Emilia-Romagna, Lombardia, Friuli Venezia-Giulia e Toscana, anche se sono presenti allevamenti di altre zone Italiane.

I parametri produttivi che vengono estrapolati dai software aziendali sono 10: n° delle scrofe in produzione, % della mortalità nelle scrofe, n° di nati totali/figliata, n° nati vivi/figliata, n° svezzati/figliata, giorni di lattazione, % della portata al parto, giorni dell’Intervallo Svezzamento – Estro (ISE), giorni del periodo di interparto, giorni di gravidanza. Da questi dati vengono successivamente elaborati dal programma altri parametri che, assieme ai precedenti, saranno visibili all’interno del Repropanel: n° di scrofe in produzione, mortalità delle scrofe, , ISCU, portata al parto, interparto, durata della gravidanza, parti/scrofa/anno, nati totali per parto, nati

vivi per parto, nati vivi/scrofa/anno, svezzati per parto, svezzati/scrofa/anno, età di svezzamento, morti per parto, % dei morti per parto, morti in lattazione, % dei morti in lattazione.

Il programma (Figura 1) offre, quindi, una serie di filtri di ricerca dei parametri desiderati, il periodo di interesse ed eventualmente consente di rappresentare i dati del proprio allevamento rispetto alla media generale. I filtri obbligatori sono il tipo di dato e il range temporale, mentre quelli opzionali riguardano le dimensioni, la regione dove sono situate le scrofaie ed il software da esse utilizzato. Una volta inseriti i dati sarà possibile avviare la ricerca, oltre a poter scaricare in formato Excel o stampare direttamente il grafico e la tabella relativi alla ricerca eseguita; inoltre, se si possiede più di un allevamento, è possibile scegliere, dalla stessa pagina, quale visualizzare per primo.

Figura 1. Motore di ricerca del Repropanel

Figure 1. Repropanel search engine

Scegli il grafico

Filtra i dati per

Tipo di dato

Numero di scrofe

Periodicità

Da anno

A anno

Trimestre

2012

2016

Paragona con l'allevamento

--Seleziona uno dei tuoi allevamenti--

Software usato

--Tutti--

Regione

--Tutte--

Dimensioni della scrofaia

--Indifferente--

Q

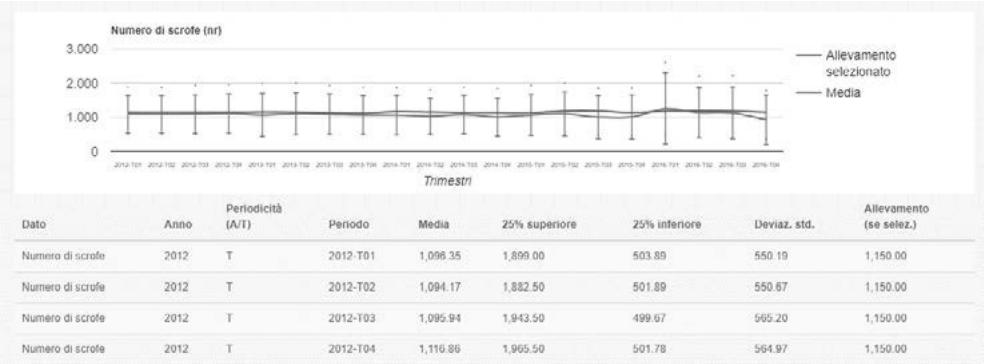
↓

🖨

Una volta avviata la ricerca sarà possibile visualizzare le statistiche, che si compongono di un grafico e di una tabella (Figura 2). Il grafico riporta l’andamento medio del dato richiesto (linea rossa) e, se è stato specificato il proprio allevamento, l’andamento di quest’ultimo (linea blu). Sono inoltre riportati gli andamenti del 25% superiore (SUP) e del 25% inferiore (INF) e la deviazione standard, ovvero l’indice di quanto il dato si discosta dalla media. Gli stessi dati sono riportati anche in tabella in forma numerica, in modo da avere un riscontro “quantificabile” oltre che visivo.

Figura 2. Grafico e tabella (qui visibile in parte) relativi alla ricerca effettuata

Figure 2. Graphic and table (here visible in part) based on the research carried out



Allo stato attuale, al fine di permettere un controllo sulla veridicità del dato raccolto, ed evitarne una sua manipolazione, Suivet snc, ha messo a disposizione un referente preposto al caricamento dei dati stessi sul sito. L'interlocutore aziendale a cui fa riferimento tale referente è il veterinario aziendale che, in sinergia con l'allevatore, produce i dati al referente, ricevendo in cambio una password in modo da permettergli una navigazione privata all'interno del sito. Così facendo gli sarà possibile confrontare i propri dati aziendali in modo assolutamente anonimo e riservato.

È importante specificare che la riservatezza dei partecipanti è rispettata, in quanto la visualizzazione dei dati forniti e dei grafici, sebbene in forma aggregata, avviene esclusivamente in forma anonima.

Applicazione web

Il Repropanel è un'applicazione web multilayer di tipo SPA (Single Page Application). In quanto applicazione web è utilizzabile via browser, quindi non è vincolata al sistema operativo dell'utente finale e non richiede installazioni di software aggiuntivi. Nelle applicazioni web tradizionali, il client (browser) inizia la comunicazione richiedendo al server una pagina. Il server processa la richiesta e invia la pagina al client. Ogni volta che l'utente naviga nel sito tramite link o quando invia un form al server, il ciclo parte da capo: il server processa la richiesta e manda una nuova pagina al client. In un'applicazione SPA invece, in seguito alla prima richiesta del browser, viene caricata un'unica pagina. Le successive richieste del browser al server porteranno ad aggiornamenti parziali della pagina senza che ci sia bisogno di ricaricarla interamente, con conseguente aumento di velocità di risposta, riduzione del traffico web e maggior fluidità nell'interazione client/server. La tecnologia adottata nello specifico è ASP.NET Web API, AngularJS e Bootstrap.

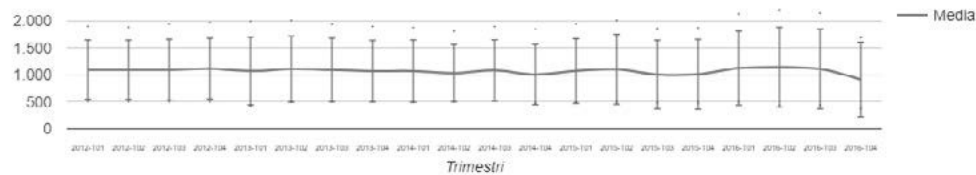
RISULTATI E DISCUSSIONE

I dati in nostro possesso rilevano che il software aziendale più utilizzato è Isaporc (75%), seguito rispettivamente da HPA (14,6%), Farmer (6,3%) e FARM (2,1%), mentre il 2,1% delle aziende non ha specificato tale informazione.

La maggior parte degli allevamenti possiede un numero di scrofe comprese tra 501 e 1500 (66,7%), mentre al secondo posto vi sono le scrofaie con meno di 500 capi (14,6%), seguite da scrofaie con 1501-2500 capi (12,5%) e con più di 2500 capi (6,3%). La principale regione di provenienza è il Veneto (29,2%), mentre un minor numero di allevamenti risiede in Emilia-Romagna (16,7%), in Lombardia (14,6%), in Friuli Venezia-Giulia (6,3%) e in Toscana (2,1%). Una grande fetta del Repropanel è, come detto data da aziende dislocate su tutto il territorio nazionale (31,2%).

Per avere un'idea dell'andamento produttivo medio italiano, avvalendosi dei soli 48 allevamenti aderenti al progetto, proponiamo in questo articolo dei grafici esplicativi, in cui viene mostrata la media di ogni parametro considerato nel Repropanel, prendendo come riferimento un periodo di tempo compreso tra il 2012 e il 2016.

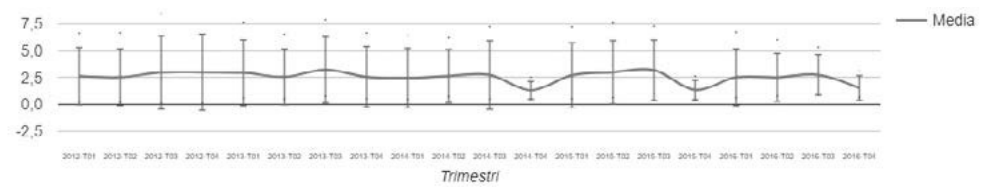
Grafico 1. Numero di scrofe in produzione
Graphic 1. Number of sows in production



Per evitare fraintendimenti è bene fornire la giusta definizione di scrofe presenti e scrofe produttive, in quanto le prime rappresentano tutti i soggetti di sesso femminile presenti in azienda che abbiano partorito almeno una volta (D.Lgs 122, 2011), mentre le seconde comprendono tutte le scrofe che rimangono all'interno del periodo produttivo (gravidе, lattanti o all'interno dell'ISE).

Dal grafico 1 è possibile vedere come la media delle scrofe in produzione sia rimasta costante nel tempo sui 1000 capi, con il SUP sopra ai 1500 e l'INF intorno ai 500.

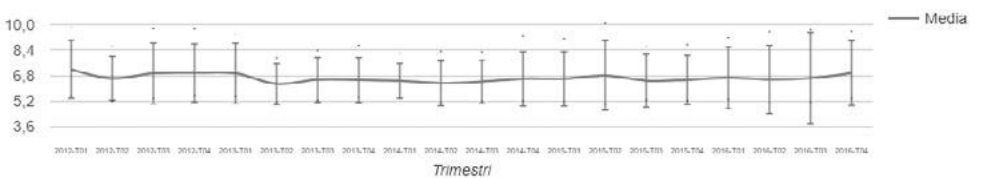
Grafico 2. Mortalità nelle scrofe
Graphic 2. Mortality in sows



La mortalità nelle scrofe si calcola come il numero di scrofe morte-anno sul numero di scrofe presenti-anno (x 100). Dati di letteratura (Koketsu, 2008) riportano un 3,9% di mortalità annuo con valori più bassi per gli ordini di parto 0 e 1 (rispettivamente 1,44% e 1,83%), che poi aumentano tra il 2° e il 5° parto (tra l'1,63% e il 5,9%).

Il grafico 2 mostra come la mortalità nelle scrofe sia rimasta sempre intorno al 2,5%, con un SUP vicino al 5-6% e un INF addirittura rasente lo 0%. Negli ultimi tre anni (2014, 2015 e 2016) è possibile apprezzare una notevole riduzione della mortalità in corrispondenza dell'ultimo trimestre (Ottobre-Novembre-Dicembre).

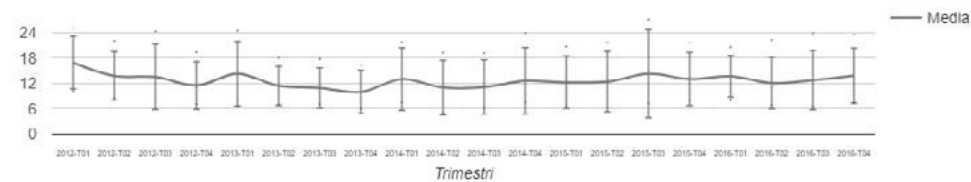
Grafico 3. ISE (Intervallo Svezamento-Estro)
Graphic 3. WEI (Weaning to Estrus Interval)



L'ISE è dato dal numero di giorni tra lo svezzamento della scrofa e il primo giorno di comparsa del riflesso di immobilità; ha una durata variabile da 3 a 6 giorni con intervallo ottimale medio intorno ai 5 giorni, mentre gli intervalli superiori ai 7 giorni sono spesso un indice di infertilità. L'obiettivo in azienda dovrebbe essere di avere il 90% di animali fecondati entro i 7 giorni dallo svezzamento (Wilson, 1993; Kemp, 1996; Knox, 2001).

Il grafico 3 mostra una media dell'ISE più vicina ai 7 giorni che agli ideali 5 giorni, a cui invece si avvicina l'INF, con un picco di 3,6 giorni in corrispondenza del terzo trimestre del 2016; al contrario il SUP arriva a toccare valori anche di 8-9 giorni. Durante l'arco dei 5 anni, comunque, l'andamento si è mantenuto pressoché costante.

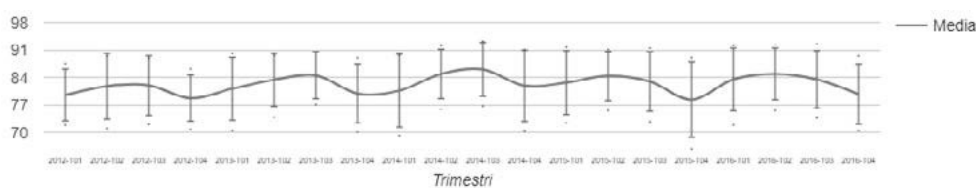
Grafico 4. ISCU (Intervallo Svezzamento-Copertura Utile)
Graphic 4. WUCI (Weaning to Useful Coverage Interval)



Per la spiegazione di tale parametro torna utile la descrizione fornita da Mario Gherpelli nel 2010: l’ISCU corrisponde al numero di giorni che sono necessari affinché una scrofa rimanga gravida dopo lo svezzamento ed è dato dalla media per scrofa dell’ISE e dalla media per scrofa dei giorni improduttivi che derivano dagli eventi negativi della gestazione (riassorbimenti embrionali, aborti, mortalità). Tutti questi giorni vengono sommati e divisi per le scrofe presenti andando così a costruire un ammontare di giorni che, sommati a quelli dell’ISE, costituiscono l’ISCU.

Dal grafico 4 è possibile notare come l’andamento dell’ISCU sia stato oscillante tra i 10 e i 16 giorni, con un SUP tra i 16 e i 24 giorni e un INF tra i 5 e i 10 giorni.

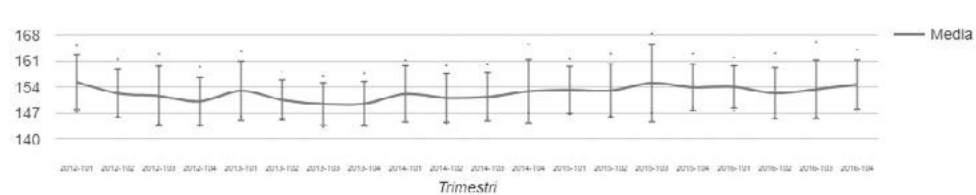
Grafico 5. Portata al parto
Graphic 5. Farrowing rate



La portata al parto è data dal numero di scrofe che partoriscono in un intervallo di tempo diviso il numero di inseminazioni effettuate nello stesso intervallo (x 100); ha un valore percentuale di riferimento dell’85%, mentre il valore limite è considerato l’80% (Muirhead, 2002; Young, 2010; Kirkwood, 2012; Mazzoni, 2007).

La portata al parto espressa nel grafico 5 si mantiene su una media compresa tra l’80 e l’86%, con picchi positivi di 90% per il SUP e picchi negativi di 70% per l’INF. L’andamento medio si è comunque dimostrato costante con il passare degli anni, con valori aumentati tra il secondo e terzo trimestre e diminuiti nel quarto trimestre di ogni anno.

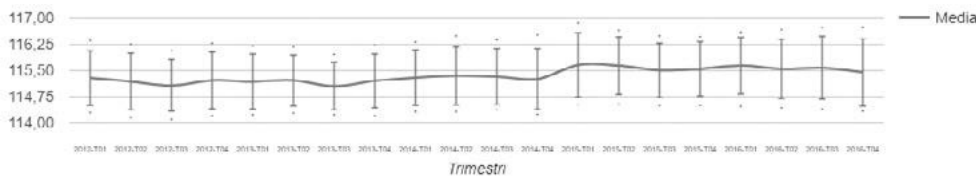
Grafico 6. Interparto
Graphic 6. Interval between farrowing



Tale periodo, espresso in giorni, corrisponde al tempo che intercorre tra un parto e il successivo ed è suddivisibile in teorico e reale: il primo è costituito dalla somma della durata della gestazione, della lattazione e dell’ISE, mentre il secondo dalla somma della durata della gestazione, della lattazione e dell’ISCU. (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012; Tonon, 2003).

Il grafico 6 illustra come l’interparto sia rimasto pressoché costante negli anni, con una media che si aggira intorno ai 150-155 giorni, un SUP intorno ai 160 giorni e un INF intorno ai 145 giorni.

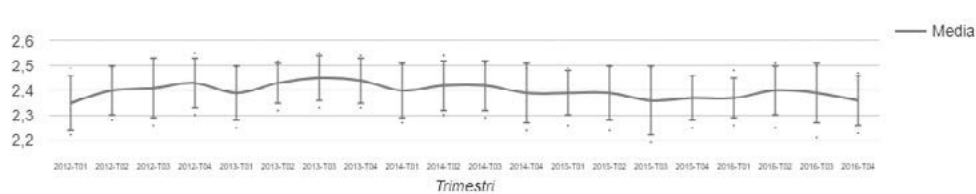
Grafico 7. Durata della gravidanza
Graphic 7. Pregnancy duration



Nella specie suina è ancora valida la regola dei 3 (3 mesi, 3 settimane, 3 giorni) che indica la durata della gravidanza di circa 114 giorni, anche se, in realtà, negli ultimi anni tale periodo sembra essersi spostato sui 115-116 giorni. Tanto la genetica, quanto fattori aziendali, possono influenzarne la durata e, inoltre, è da tenere presente che la variazione può interessare il medesimo individuo nel corso della carriera produttiva (Merck Manual, 2011).

Il grafico 7, effettivamente, conferma lo spostamento della durata della gravidanza sui 115 giorni, per poi avvicinarsi ai 116 con l’inizio del 2015. Il SUP, comunque, non raggiunge mai i 117 giorni, mentre l’INF non arriva mai ai 114 giorni.

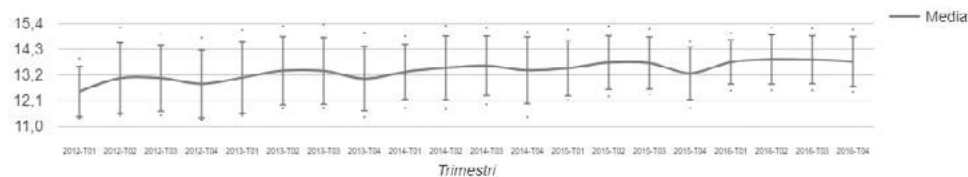
Grafico 8. Parti/scrofa/anno
Graphic 8. Farrowing/sow/year



Il n° di parti/scrofa/anno rappresenta il così detto “indice di parto”, ovvero il numero di volte nel quale una scrofa (o un gruppo di scrofe) partorisce in 365 giorni; tale indice dipende dalla durata dell’interparto. Si può ritenere che valori di 2,3 parti/scrofa/anno siano da considerarsi accettabili (Saunders Dictionary, 2007).

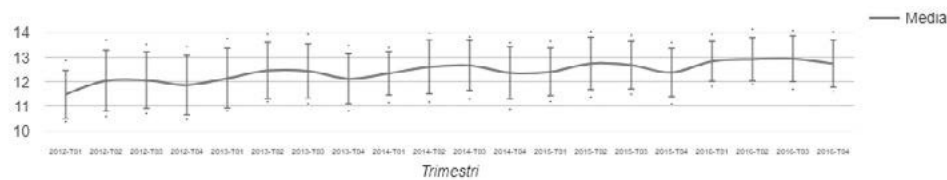
La media mostrata nel grafico 8 è rimasta costante negli anni intorno ai 2,4 parti/scrofa/anno, con un SUP che raggiunge i 2,5-2,6 e un INF che tende a rimanere sui 2,3, con qualche allevamento vicino ai 2,2 parti/scrofa/anno.

Grafico 9. Nati totali per parto
Graphic 9. Total born on farrowing



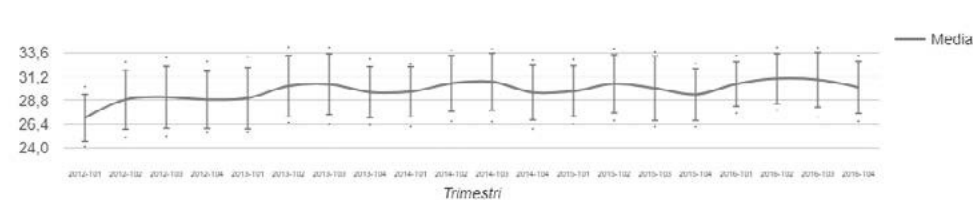
Per nati totali si intende il numero totale di suinetti nati, sia vivi che morti, esclusi i mummificati (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012; Pork Gateway, 2012). Nel corso degli anni vi è stato un netto miglioramento di tale parametro, come illustrato nel grafico 9, considerando che nel 2012 la media si aggirava intorno ai 12,3 nati totali e nel 2016 si è arrivati a 14; il SUP arriva anche ai 15 nati totali, mentre l'INF rimane intorno ai 12. Tuttavia in tutti gli anni si assiste ad una diminuzione dei nati totali, seppur piccola, in corrispondenza del quarto trimestre, che si conferma essere uno dei periodi più delicati dell'anno.

Grafico 10. Nati vivi per parto
Graphic 10. Born alive on farrowing



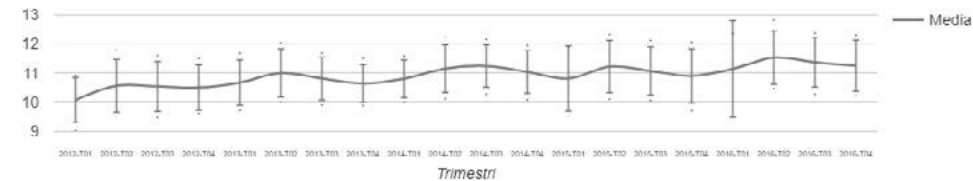
Per nati vivi per parto si intende il numero di suinetti nati vivi esclusi i nati morti e i mummificati. I dati di riferimento sono molto variabili, poiché dipendono da molti fattori, quali l'età alla copertura, il peso e la genetica; nelle scrofette il dato di riferimento può variare tra i 10,5 e i 12,5 mentre nelle scrofe i valori si attestano tra i 12 e i 14 suinetti nati vivi (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012; Pork Gateway, 2012). Il grafico 10 mostra come il numero di nati vivi sia in costante aumento, in particolare si ha avuto un incremento di 1,5 suinetti in 5 anni (11,5 nati vivi nel 2012 vs 13 nati vivi nel 2016). Il SUP sfiora i 14 nati vivi nel 2016, mentre l'INF si è spostato da 10,5 nati vivi nel 2012 a 12 nel 2016. È da notare come, sempre nel quarto trimestre di ogni anno, si assiste ad una diminuzione dei nati vivi per parto.

Grafico 11. Nati vivi/scrofa/anno
Graphic 11. Born alive/sow/year



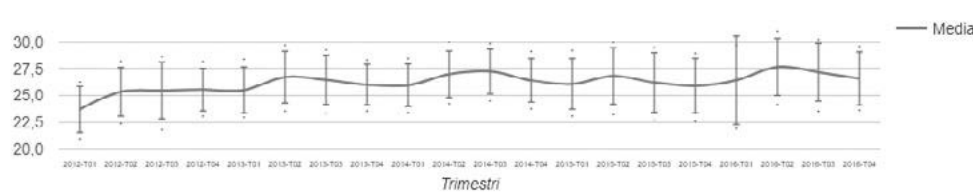
Questo dato si ricava dal numero totale dei nati vivi sulla media delle scrofe produttive nello stesso anno (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012; Pork Gateway, 2012). Il numero di nati vivi/scrofa/anno, come mostrato nel grafico 11, ha subito un netto aumento tra l'inizio del 2012 e il secondo trimestre del 2013, passando da 27 nati vivi a 30, per poi mantenere un andamento ondulatorio negli anni successivi, rimanendo comunque intorno ai 29-30 nati vivi/scrofa/anno. Il SUP raggiunge anche picchi di 33,6 nati vivi, mentre l'INF si avvicina ai 26. Viene sempre confermata una diminuzione dei nati vivi/scrofa/anno in corrispondenza del quarto trimestre di ogni anno.

Grafico 12. Svezziati per parto
Graphic 12. Weaned on farrowing



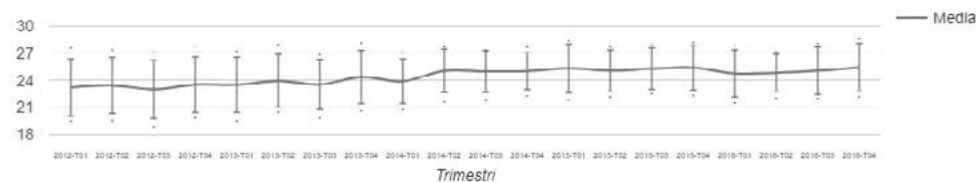
Il numero di svezziati per parto è rappresentato dai suinetti che sono rimasti effettivamente vivi al momento dello svezzamento, escludendo quindi i morti in lattazione. Il grafico 12 mostra che questo dato, come i precedenti, ha subito un miglioramento nel corso degli anni, passando da 10 svezziati nel 2012 (con un SUP di circa 11 e un INF di circa 9) a 11,3 svezziati nel 2016 (con un SUP di circa 12 e un INF di circa 10). L'andamento risulta essere in linea con quello osservato nei grafici precedenti, ma ciò che è maggiormente evidente è la presenza di un picco positivo di 13 svezziati nel primo trimestre del 2016 per il SUP, a cui però corrisponde un picco negativo di 9,5 svezziati per l'INF.

Grafico 13. Svezziati/scrofa/anno
Graphic 13. Weaned/sow/year



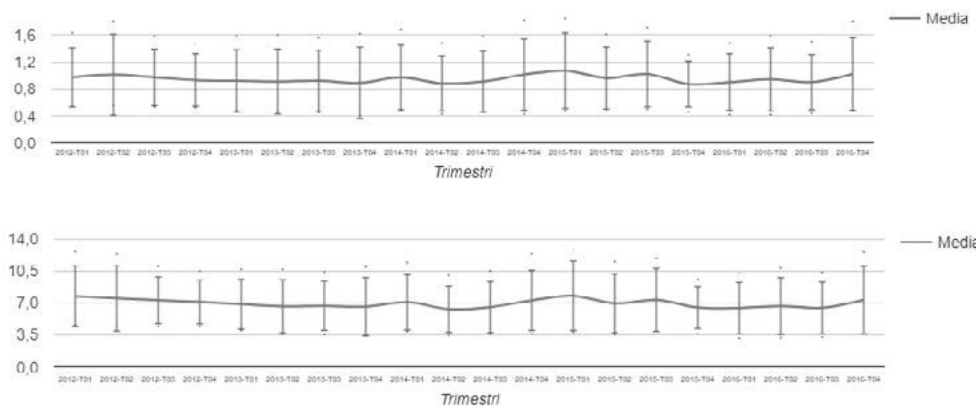
Questo dato si ricava dividendo il numero di suinetti svezziati annualmente per il numero medio di scrofe presenti al momento della copertura (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012). Anche in questo caso, come per i nati vivi/scrofa/anno (Grafico 11), si ha avuto un netto incremento degli svezziati tra l'inizio del 2012 (media di 24, SUP di 26 e INF di 21,5) e il secondo trimestre del 2013 (media di 27, SUP di 29 e INF di 24), per poi mantenere un andamento ondulatorio costante negli anni successivi, evidenziando il picco massimo nel secondo trimestre del 2016 (media di 27,5, SUP di 31, INF di 25).

Grafico 14. Età di svezzamento
Graphic 14. Weaning age



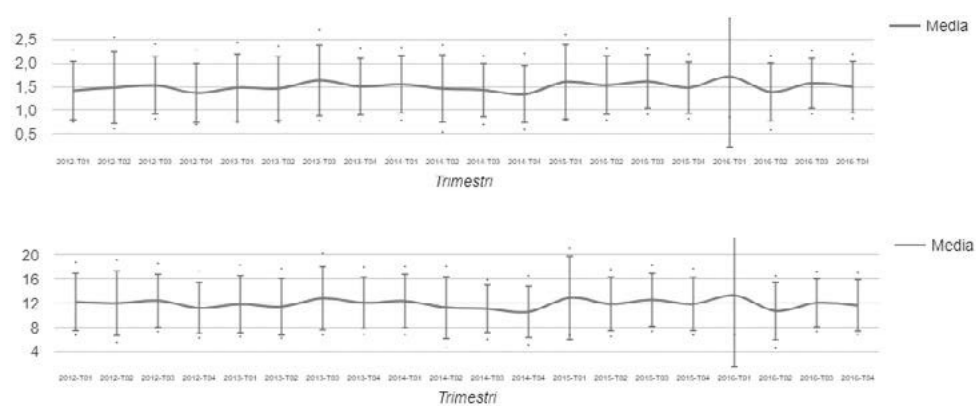
Questo parametro corrisponde al periodo che va dal parto allo svezzamento dei suinetti ed è dato dalla somma dei giorni totali di lattazione diviso il numero totale di scrofe svezzate in quel periodo (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012; Muirhead, 2002). Nel grafico 14 si osserva come l'età media di svezzamento sia leggermente aumentata nel corso degli anni, passando da 23 giorni nel 2012 a 25 nel 2016; il SUP si è mantenuto costante tra i 26 e i 28 giorni, mentre l'INF è passato da 19-20 a 22-23 giorni

Grafico 15. Morti per parto (sopra) e relativa percentuale (sotto)
Graphic 15. Deaths on farrowing (over) and corresponding rate (under)



I nati morti per parto sono dati dal numero totale dei nati morti diviso il numero totale dei nati (DPT of Agr., Fish. And For. 1995-2012). Il dato di riferimento è variabile: non dovrebbe superare il 5% con un valore limite del 10% riferito alla natalità totale (Mazzoni, 2007; Vallet, 2009; Foxcroft, 2012; Borges, 2005). I due grafici appena sopra rappresentano entrambi la mortalità per parto, il primo in forma numerica e il secondo in percentuale, e per tale motivo risultano essere identici. È possibile osservare come la media dei morti sia rimasta tendenzialmente invariata sul 6-8%, dimostrandosi così coerente con i riferimenti letterari. Negativa è la situazione del SUP, che più di una volta ha superato il 10,5%, sfiorando nelle altre situazioni quasi sempre i 10%; molto buona risulta invece essere la situazione dell'INF con una percentuale di morti che si aggira attorno al 3,5.

Grafico 16. Morti in lattazione (sopra) e relativa percentuale (sotto)
Graphic 16. Deaths during lactation (over) and corresponding rate (under)



La mortalità dei suinetti durante la lattazione è legata a diversi fattori: inedia (50%), schiacciamento (40%) e patologie (10%). Ha un valore totale tra l'8 ed il 12%, anche se in alcuni casi può raggiungere il 15%; questo è in base alla natalità, maggiore nelle genetiche iperprolifiche, ed è calcolata partendo solo dai nati vivi (Mazzoni, 2007). I grafici appena sopra mostrano entrambi la mortalità in lattazione, di cui il primo in forma numerica e il secondo in percentuale. La mortalità media si è mantenuta pressoché costante sul 12%, quindi al limite del valore di riferimento, con lievi aumenti e diminuzioni nel corso degli anni; il SUP si porta addirittura fino al 20% nel primo trimestre del 2015, mentre l'INF rimane sempre intorno al 6-8%. L'aspetto più eclatante è certamente rappresentato dal primo trimestre del 2016, dato che coincide perfettamente con la situazione già osservata nel Grafico 12, in cui sono rappresentati gli svezzati per parto: in questo periodo, infatti, è stata riscontrata un'alta mortalità in lattazione (> 20%) a cui corrisponde un basso numero di svezzati (9,5 suinetti), e, viceversa, la bassa mortalità in lattazione (< 4%) è corrisposta ad un alto numero di svezzati (13 suinetti).

CONCLUSIONI

Dall'analisi dei dati appena effettuata è stato possibile rendersi conto del miglioramento produttivo avuto negli ultimi anni, oltre ad evidenziare gli aspetti su cui è possibile ricercare un miglioramento delle performance aziendali. Il progetto Repropanel si propone di stimolare l'allevatore a valutare in modo critico il proprio andamento produttivo, confrontandosi, in maniera del tutto anonima, con molti altri allevamenti e colleghi Italiani, percependo chiaramente il proprio margine di miglioramento. Allo stesso tempo, la presenza di un numero sempre maggiore di allevamenti potrebbe consentire al progetto di assumere di volta in volta un valore aggiuntivo, potendo proporre una media sempre più vicina alla realtà nazionale. È bene, comunque, che il Medico Veterinario aziendale accompagni l'allevatore nella valutazione dell'andamento produttivo, in modo da poter consigliare nella maniera più opportuna il modo di migliorare gli aspetti negativi o, al contrario, di valorizzare gli aspetti positivi.

BIBLIOGRAFIA

- Berchmans M. Britto, "Content analysis", in Lever F., Rivoltella P. C., Zancchi A. (edd.), "La comunicazione. Dizionario di scienze e tecniche", www.lacomunicazione.it (31/01/2018).
- Borges V. F. et al. (2005) "Risk factors for stillbirths and foetal mummification in four Brazilian swine herds". Preventive Veterinary Medicine.
- Caleffi A., Calisesi L., Casappa P., De Rensis F., Fruttero F., Lasagna C., Mazzoni C., Sandri G., Tonon F. "Glossario di Riproduzione Suina", I^a Edizione, Ceva Salute Animale S.p.A.
- Decreto legislativo 2011, n. 122. Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione suini. (11G0164)(GU Serie Generale n. 178 del 02-08-2011).
- Department of Agriculture, Forestry and Fisheries (1995-2012), Queensland.
- Foxcroft G. R. (2012) "Reproduction in Farm animals in an era of rapid genetic change: will genetic change outpace our knowledge of physiology?". Reproduction in domestic animals.
- Gherpelli M. (2010) "Massimizzare il n° di parti/scrofa/anno". Disponibile su www.suivet.it.
- Kemp B., Soede N. M. (1996) "Relationship of weaning-to-estrus interval to timing of ovulation and fertilization in sows". Journal of animal science 74, 944-949.
- Kerlinger F. N., Lee H. B., (2000) "Foundation of behavioral research". Harcourt College Publishers, Fort Worth (TX).
- Kirkwood R. (2012) "Come migliorare la fertilità delle scrofe". 3tre3 website (sezione "La parola agli esperti").
- Knox R. V. (2001) "Factors influencing estrus and ovulation in weaned sows as determined by transrectal ultrasound". Journal of animal science.
- Koketsu Y. Et al. (2008) "Mortality, death interval, survivals and herd factors for death in gilts and sows in commercial breeding herds". Journal of animal science.
- Mazzoni C. (2007) "La gestione della sala parto". I manuali pratici di professione suinicoltore.
- Muirhead M. R. et al. (2002) "Managing pig health and the treatment of disease: a reference for the farm".
- Pork Gateway – U.S PCE (2012). Des Moines, IA 50325, Stati Uniti.
- Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary, 3rd edition, 2017.
- The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, 2 settembre 2011.
- Tonon F. (2003) "La gestione della scrofa in bande". XXVIII corso di Patologia suina e Tecnica dell'allevamento.
- Vallet J. L. et al. (2009) "Proportion of the litter farrowed, litter size and progesterone and estradiol effects on piglet birth intervals and stillbirths". Animal reproduction science.
- Wilson M. R., Dewey C. E. (1993) "The associations between weaning-to-estrus interval and sow efficiency". Swine Health Prod 1, 10-15.
- Young B. et al. (2010) "Management factors associated with farrowing rate in commercial sow herds in Ontario". Canadian Veterinary Journal.

EFFETTI DELLA SOMMINISTRAZIONE DI PROSTAGLANDINE NATURALI NEL POST-PARTUM DELLA SCROFA NELL'ALLEVAMENTO SUINICOLO INDUSTRIALE

EFFECT OF NATURAL PROSTAGLANDINS ADMINISTERED POST-PARTUM TO THE SOW IN THE INDUSTRIAL PIG PRODUCTION

RAFFI V.¹, CASAPPA P.², MAZZONI C.¹, SCOLLO A.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 illustra gli effetti clinici della somministrazione di prostaglandine nel post-partum in diverse categorie di scrofe, identificando quelle che beneficino maggiormente del trattamento. Sono state monitorate durante il loro post-partum 87 scrofe: gruppo controllo (n = 43 scrofe, nessun trattamento farmacologico post-partum), e gruppo trattato con dinoprost (n = 45; 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 ordine di parto. Tra le sottoclassi di scrofe trattate con dinoprost, migliorano le condizioni cliniche di quelle con ordine di parto 5-6 (minore infiammazione della ghiandola mammaria, P = 0,009), di quelle che avevano ricevuto più di cinque esplorazioni uterine (minori scoli vaginali, P = 0,026) e di quelle con almeno tre nati morti (maggiore eiezione di latte, P = 0,05). Il presente studio suggerisce che il trattamento con dinoprost sia in grado di migliorare alcuni parametri clinici in classi di scrofe problema.

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. Eighty-seven sows were monitored during the post-partum: control group (n = 43 sows, no postpartum drug treatment), and treated group by dinoprost (n = 45; 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 parity. Among the subclasses of sows treated with dinoprost, clinical parameters were improved in 5-6 parity sows (reduced breast inflammation, P = 0,009), in sows that received at least five uterine explorations (reduced vaginal discharges, P = 0,026) and sows with at least three stillbirth piglets (increased milk ejection, P = 0,05). 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 il loro utilizzo anche nell’immediato post-partum è pratica diffusa per migliorare le condizioni delle scrofe, stimolando un più veloce ritorno alla ciclicità dopo lo svezzamento e prevenendo problematiche cliniche che spesso si traducono in una perdita di produttività più o meno pesante per la scrofaia. Nel 1990, Gil et al. riportarono i primi interessanti risultati utilizzando il PGF2α 24-48 ore dopo il parto in una azienda con ricorrenti casi di scoli vaginali e ritardati ritorni in estro, osservando un miglioramento clinico degli animali con particolare riferimento alla riduzione degli scoli vulvari. Il miglioramento di questo parametro aveva portato un conseguente miglioramento della produttività aziendale in termini di natalità, ritorni in calore, e performances al parto successivo. Più recentemente (Scollo et al., 2017), è stato condotto uno studio i cui dati preliminari hanno illustrato 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. Nel presente lavoro sono illustrati i dati completi dello studio, accompagnati anche dalle performances ottenute nel parto successivo della scrofa, con lo scopo di completare le informazioni a disposizione sull’utilizzo di questo ormone in tutte le classi di rischio riproduttivo delle scrofe.

MATERIALI E METODI

Animali e management

Lo studio è stato condotto in una scrofaia, situata in provincia di Brescia, da Maggio a Luglio. Sono state monitorate durante il loro post-partum 87 scrofe di genetica ibrida, con ordini di parto dal secondo al tredicesimo. Il numero totale di suinetti nati dalle 87 scrofe è stato 1.246, monitorati, insieme alla scrofa, durante la lattazione. Le scrofe ed i suinetti sono stati 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 = 43 scrofe), che non ha ricevuto alcun trattamento farmacologico post-partum, ed il gruppo trattato con dinoprost (n = 45; 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, 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: 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 stata valutata dal veterinario, mentre l’eiezione del latte è stata valutata tramite la mungitura manuale di un numero rappresentativo di capezzoli (almeno 6) di ciascuna scrofa (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 (Scollo et al., 2017).

Table 1. Description of scores on clinical parameters evaluated in sows three days after farrowing (Scollo et al., 2017).

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 < 2h; intermedio 2-3h; lento >3); esplorazioni uterine (poche ≤2; intermedie 3-4; tante ≥5); ordine di parto (giovani ≤4 scrofe; intermedie 5-6; vecchie ≥7) e numero di nati morti (pochi ≤1; intermedi 2; molti ≥3).

RISULTATI E DISCUSSIONE

La prova ha coinvolto quattro 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: 3,06±1,36 ore; numero di esplorazioni uterine: 3,2±1,4; numero di nati vivi: 12,8±3,4; numero di nati morti: 1,4±1,8; numero di nati totali: 14,2±3,4; numero di suinetti mummificati: 0,6±1,0. I dati clinici delle scrofe raccolti tre giorni dopo il parto sono riportati in tabella 2. Purtroppo non si è evidenziata nessuna differenza statistica tra i parametri clinici, perdendo anche la significatività dell’aumentata frequenza respiratoria nelle scrofe trattate riscontrata nel precedente lavoro (Scollo et al., 2017). D’altra parte,

l'aumento di questo parametro rappresenta uno dei blandi effetti collaterali del farmaco (Connor et al., 1979), che non necessariamente si manifesta. Come già suggerito nella stesura dei dati preliminari, l'assenza di evidenti differenze tra i dati clinici potrebbe essere dovuta al basso numero di animali coinvolti nella prova, oppure all'assenza di evidenti problematiche riproduttive nell'azienda ospitante. Altri autori (Morrow et al., 1996) hanno evidenziato una tendenza statistica al miglioramento dei dati raccolti a favore del gruppo trattato (riferiti alle performances 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	97,6	97,8	Ns
	Score 2	2,4	2,2	
Frequenza respiratoria (atti inalatori/min)	Score 1	47,0	68,0	Ns
	Score 2	47,0	16,0	
	Score 3	5,9	12,0	
	Score 4	-	4,0	
Ingestione alimentare	Score 1	95,2	95,5	Ns
	Score 2	4,8	2,2	
	Score 3	-	2,2	
	Score 4	-	-	
Scoli vaginali	Score 1	59,5	60,0	Ns
	Score 2	30,9	31,1	
	Score 3	7,1	8,9	
	Score 4	2,4	-	
Infiammazione della mammella	Score 1	69,0	81,8	Ns
	Score 2	23,8	13,6	
	Score 3	7,1	4,5	
	Score 4	-	-	
Eiezione di latte	Score 1	80,9	84,4	Ns
	Score 2	19,0	15,5	
	Score 3	-	-	

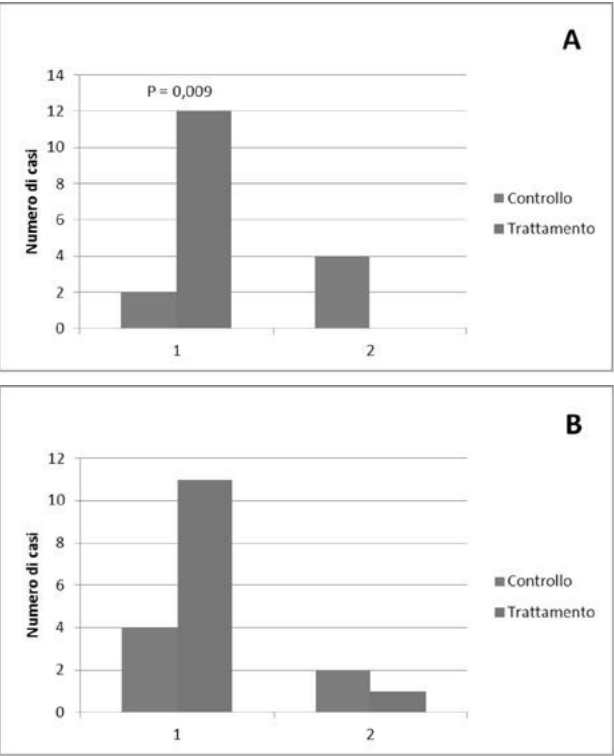
Tabella 2. Frequenza percentuale delle scrofe che hanno manifestato ciascun punteggio per ciascuna variabile osservata nei due gruppi. “-“= Nessuna scrofa registrata nello specifico score clinico.

Table 2. Frequency percentage of sows that showed each score for each variable observed in the two groups. “-“= No sows recorded in the specific clinical score.

Se le analisi tra i due gruppi non hanno evidenziato differenze significative, l'indagine approfondita nelle sottoclassi ha fatto emergere alcune differenze che 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 hanno già affrontato 5-6 parti nella loro carriera hanno beneficiato del trattamento mostrando una minore infiammazione della ghiandola mammaria (P = 0,009). Inoltre, le stesse scrofe hanno mostrato anche una maggiore capacità nell'eiezione del latte, sebbene quest'ultimo parametro non sia pienamente supportato dall'analisi statistica (Figura 1).

Figura 1. Rappresentazione grafica dei punteggi relativi all'infiammazione della mammella (A) e all'eiezione del latte (B) nei gruppi trattato e controllo all'interno del sottogruppo di scrofe con 5-6 parti nella loro carriera. Lo score 3 non è stato osservato nel sottogruppo considerato; valori di P < 0,05 rappresentano significatività statistica.

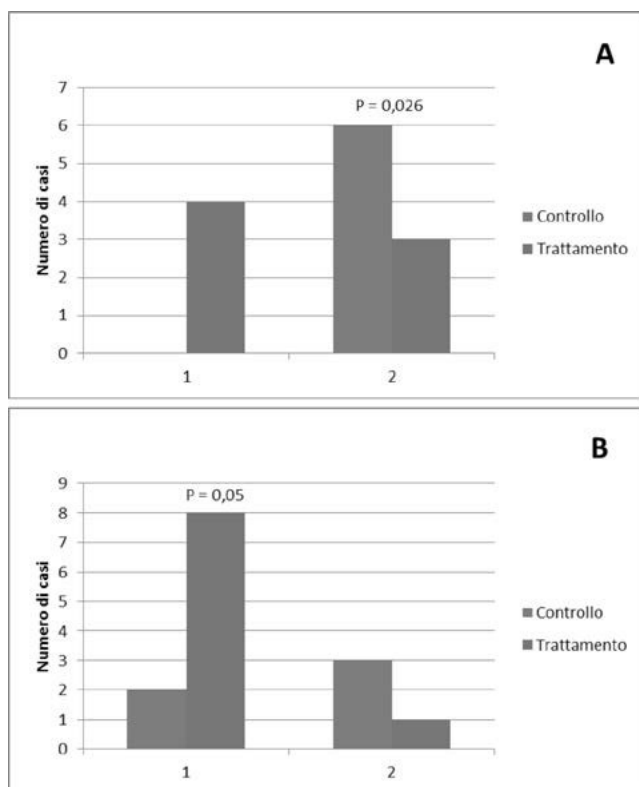
Figure 1. Graphic representation of the scores for inflammation of the breast (A) and milk ejection (B) in the treated and control groups within the subgroup of sows that farrowed 5-6 times. Score 3 was not observed in the considered subgroup; P < 0,05 values represent statistical significance.



Una seconda classe di scrofe che ha beneficiato del trattamento è quella rappresentata da animali che, per problemi legati al parto avevano avuto bisogno di almeno cinque esplorazioni uterine da parte di un allevatore. In questi casi, il trattamento ha ridotto gli scoli vaginali registrati tre giorni dopo il parto (P = 0,026; Figura 2A). D'altra parte questo tipo di risultato è pienamente comprensibile se si considera che ogni esplorazione uterina effettuata, per quanto utile e ben condotta, aumenta il rischio di introdurre nel canale del parto materiale non sterile che predispone all'infiammazione o addirittura all'infezione dell'apparato riproduttore della scrofa, con inevitabile sintomatologia clinica legata agli scoli. Per questo motivo si consiglia di effettuare le esplorazioni uterine solo quando strettamente necessarie, e di osservare sempre la più completa igiene possibile, come per esempio l'utilizzo di guanti usa e getta e gel lubrificante, lavarsi spesso le mani e le braccia e pulire la vulva prima dell'ingresso per l'esplorazione. La somministrazione di Dinoprost nel post-partum ha aiutato a migliorare i parametri clinici anche del sottogruppo di scrofe che hanno dato alla luce almeno tre suinetti morti durante il parto. In questi animali, il trattamento ha aiutato migliorando la produzione di latte (P = 0,05; Figura 2B).

Figura 2. Rappresentazione grafica dei punteggi relativi agli scoli vaginali (A) e all'eiezione del latte (B) nei gruppi trattato e controllo all'interno del sottogruppo di scrofe rispettivamente che avevano ricevuto più di cinque esplorazioni uterine durante il parto e scrofe che hanno dato alla luce almeno tre suinetti nati-morti. Lo score 3 non è stato osservato nel sottogruppo considerato; valori di $P < 0,05$ rappresentano significatività statistica.

Figure 2. Graphic representation of the scores for vaginal discharges (A) and milk ejection (B) in the treated and control groups within the subgroup of sows that, respectively, received at least five uterine explorations and that gave birth to at least three stillborn piglets. Score 3 was not observed in the considered subgroup; $P < 0,05$ values represent statistical significance.



I risultati suggeriscono che il trattamento con dinoprost sia in grado di migliorare alcuni parametri clinici in classi di scrofe problematiche. Questo sottolinea l'importanza dell'utilizzo del farmaco in modo mirato: per quanto il primo approccio in azienda dovrebbe essere sempre quello dell'introduzione a tappeto dell'intervento, non potendo escludere che un'azienda con problematiche cliniche più evidenti possa beneficiare di un trattamento dell'intera mandria di scrofe, è utile sottolineare come nella moderna suinicoltura si stia abbandonando il trattamento di massa a favore di un'attenzione individuale che si era persa negli ultimi decenni. Se questo è particolarmente vero per l'utilizzo degli antibiotici, è vero anche che la tendenza attuale è quella di tornare a considerare l'animale come singolo individuo che, se trattato per le sue specifiche necessità mediche e manageriali, produrrà di più e godrà di maggiore benessere.

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.
- Scollo, A., Trogu, E., Casappa, P., & Mazzoni, C. (2017). Effect of prostaglandins administered post-partum to the sow: preliminary results on clinical parameters [Conference poster]. In *Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XLIII Meeting Annuale*, Reggio Emilia, Italia, 16-17 Marzo 2017 (pp. 229-234). Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS).

CASI CLINICI

CASO CLINICO: FOCOLAIO DI CLOSTRIDIOSI DA *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* IN SUINETTI NEONATI

DE LORENZI G.¹, PELLACINI M.², GHERPELLI Y.¹, GIBELLI L.³, PANGALLO G.¹,
BONILAUDI P.¹, DOTTORI M.¹, LUPPI A.¹

¹IZSLER, Reggio Emilia, Italy.

²Ferrero Mangimi spa, Parma, Italy.

³IZSLER, Milano, Italy.

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è descrivere un focolaio di diarrea neonatale da *Clostridium difficile* verificatosi in un'azienda da riproduzione (sito 1) del nord Italia. L'esame colturale, l'esame immunoenzimatico per la ricerca delle tossine e l'esame istologico hanno permesso di confermare la diagnosi di clostridiosi enterica da *C. difficile*. L'allestimento del vaccino stabulogeno e l'implementazione delle misure di biosicurezza adottate hanno permesso la risoluzione del focolaio e di ridurre l'impiego di antibiotici per il contenimento della problematica descritta. La diarrea neonatale è un problema sanitario rilevante nell'allevamento suino. La diagnosi differenziale della diarrea neonatale comprende infezioni batteriche, virali o parassitarie. I clostridi agenti causali di diarrea neonatale sono *C. perfringens* (tipo A e C) e *C. difficile* e quest'ultimo può essere la causa di più della metà delle forme enteriche che si verificano in sala parto (Songer et al., 2000). La fonte d'infezione per i suinetti è rappresentata dall'ambiente in cui le spore vengono eliminate con le feci della scrofa e con le feci dei suinetti del ciclo precedente (Songer, 2012). Le spore ingerite dai suinetti germinano nell'ileo, nel cieco e nel colon con successiva adesione delle forme vegetative alle cellule epiteliali. In assenza di una flora batterica intestinale competitiva le forme vegetative replicano rapidamente ed iniziano a produrre le esotossine responsabili della sintomatologia clinica e delle lesioni anatomopatologiche, quali edema del mesocolon e colite (Yaeger et al., 2007).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico in oggetto ha avuto luogo in un'azienda da riproduzione (sito 1) di 900 scrofe a banda settimanale. I suinetti venivano svezzati a 28 giorni di vita e venduti a 7 kg di peso. Il piano vaccinale di scrofe e suinetti è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano vaccinale di scrofe e suinetti (sito 1)

Table 1. Vaccinations of sows and piglets (site 1)

SCROFE
PRV + PRRSV + SIV + <i>H. parasuis</i> + Parvovirus + <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>
SUINETTI
Mhyo + PCV2 + <i>Lawsonia intracellularis</i>

A settembre 2017 si osservava la comparsa di forme enteriche e morte improvvisa in suinetti di 2-3 giorni di vita. La morbilità e la letalità osservate erano rispettivamente del 15% e del 90%. Otto suinetti di 3 giorni di vita sono stati quindi conferiti e sottoposti ad esame necroscopico presso l'IZSLER (sezione di Reggio Emilia). I suinetti erano disidratati, anemici e la regione perineale appariva imbrattata di feci diarroiche di colore giallo. All'apertura della cavità addominale si osservava meteorismo intestinale con assottigliamento della parete del piccolo intestino, edema del mesocolon, contenuto di colore giallo e di consistenza pastosa nel colon (Figura 1 e 2). In alcuni soggetti lo stomaco si presentava vuoto, mentre in altri conteneva latte coagulato. Nessun'altra lesione macroscopicamente evidente si osservava in altri organi o apparati.

Le diagnosi differenziali considerate comprendevano forme gastroenteriche sostenute da: *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* tipo A, *Escherichia coli* enterotossigeni, *Salmonella* spp, *Isospora suis*, Rotavirus e virus della diarrea epidemica suina (PEDV).

In sede necroscopica sono stati prelevati campioni da destinare ad indagini diagnostiche (Tab.2).

Campioni di colon sono stati congelati a -20° C per la ricerca delle tossine TcdA e TcdB di *C. difficile*, utilizzando un test commerciale rapido di tipo immunocromatico. Il congelamento dopo il prelievo permette di ridurre risultati falsi negativi, in quanto le tossine di *C. difficile* sono termolabili e tendono a denaturarsi rapidamente.

Per l'isolamento di *C. difficile* il materiale diarroico contenuto nel colon è stato sottoposto a shock alcolico al fine di selezionare solo le spore di *C. difficile* che riescono a sopravvivere a questa procedura, eliminando così tutti gli altri microrganismi fecali non sporigeni. Il materiale patologico è stato successivamente miscelato con vortex e lasciato sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente. Il sedimento è stato poi seminato su Columbia agar e incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi.

C.difficile è stato isolato in coltura pura da tutti i campioni di grosso intestino sottoposti ad indagine batteriologica. Il test rapido immunocromatico ha permesso di identificare le tossine TcdA e TcdB nei campioni testati.

All'esame istopatologico del colon si osservava infiltrazione di neutrofili nella lamina propria e lesioni erosive a carico dell'epitelio della mucosa intestinale, permettendo così di formulare diagnosi di colite a carattere erosivo. Non erano presenti alterazioni significative nel piccolo intestino e in altri parenchimi.

I risultati degli esami di laboratorio effettuati sono riportati in Tabella 2.

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame culturale	Rene e milza	Semina su agar siero e Gassner agar incubati a 37°C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni
	Piccolo intestino	Semina su agar globuli incubato a 37°C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni
		Semina su agar globuli incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi	Negativo per agenti patogeni
	Colon	Semina su Columbia agar incubato a 37°C per 48 ore in anaerobiosi	Sviluppo di <i>Clostridium difficile</i>
Esame parassitologico	Pool di feci	Ricerca di uova di parassiti gastro-intestinali mediante osservazione microscopica previo arricchimento per flottazione	Negativo
PCR Rotavirus (Elschner et al., 2002)	Intestino	Rilevazione della presenza di Rotavirus attraverso l'amplificazione di cDNA a partire da una sequenza specifica di RNA virale del genoma dei Rotavirus gruppo A	Negativa
RT-PCR Real-time PEDV (https://www.cahfs.umn.edu/sites/cafhs.umn.edu/files/rt-pcr-assay-veterinay-diagnostic-lab.pdf)	Intestino	Rilevazione della presenza dell'RNA del virus della diarrea epidemica del suino tramite One-step RT-PCR Real-Time	Negativa
Kit rapido immunoenzimatico	Intestino	Test rapido immunocromatico per le tossine TcdA e TcdB di <i>C. difficile</i>	Positivo
Istologia	Intestino, colon, rene, milza, polmone, fegato, cervello	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, previa fissazione dei campioni in formalina al 10%	Colite a carattere erosivo. Assenti alterazioni significative nel piccolo intestino e in altri parenchimi

Tabella 2. Campioni prelevati per indagini diagnostiche e risultati
Table 2. Samples collected for diagnostic investigations and results

DISCUSSIONE

Il caso clinico presentato riguarda un caso di diarrea neonatale da *C. difficile* in un'azienda da riproduzione. La diagnosi di enterocolite da *C. difficile* si è basata sul rilievo dei quadri clinici ed anatomopatologici ed è stata confermata dall'isolamento del batterio, dalla dimostrazione delle tossine e dai rilievi istopatologici. Il solo isolamento del batterio non è sufficiente per confermare la diagnosi, il quale infatti è un normale componente della flora intestinale del suino ed esistono ceppi non patogeni che non producono tossine. La conferma di colite da *C. difficile* si ha infatti con la dimostrazione della presenza delle tossine nelle feci o nel contenuto del colon, normalmente impiegando test rapidi immunocromatici generalmente impiegati per la diagnosi di clostridiosi da *C. difficile* nell'uomo. *C. difficile* produce tre principali esotossine: tossina A (TcdA), tossina B (TcdB) e una tossina binaria (CDT). TcdA è un'enterotossina responsabile della perdita di fluidi dall'intestino, mentre TcdB è una citotossina che da sola non è in grado di provocare la patologia, ma potenzia l'azione della tossina A (Songer, 2012). La maggior parte dei ceppi patogeni producono entrambe le tossine, anche se l'azione patogena è mediata principalmente dalla tossina A. L'importanza della tossina CDT nell'insorgenza dei sintomi invece non è ancora ben conosciuta.

Una volta confermata la diagnosi i suinetti con sintomatologia clinica sono stati trattati con tilosina (10 mg/kg) per 3 giorni per via parenterale, ottenendo un buon risultato nel controllo dei sintomi. I ceppi isolati in laboratorio mediante esame colturale sono stati successivamente utilizzati per produrre il vaccino stabulogeno da impiegare in allevamento. Il vaccino stabulogeno inattivato contiene corpi batterici e tossoidi A e B del *C. difficile*, adiuvato a idrossido di alluminio. Il piano di vaccinazione base ha previsto due interventi, il primo a tutte le scrofe e scrofette, il secondo a 20 giorni di distanza dal primo sugli stessi soggetti. Il programma vaccinale proseguirà secondo lo schema previsto, con richiamo 30 giorni prima del parto e continuando la vaccinazione di base nelle scrofette.

Negli ultimi anni la clostridiosi enterica è diventata una causa comune di mortalità nei suinetti sotto scrofa, frequentemente associata a scarsa igiene, svezzamento precoce e stress ambientale. Nell'allevamento oggetto del caso clinico il miglioramento delle condizioni igieniche hanno permesso di ridurre la carica batterica a cui i suinetti erano esposti, contribuendo così a minimizzare il rischio di malattia. Dopo l'adozione delle misure terapeutiche sopracitate, delle misure igieniche e della vaccinazione non sono stati più riscontrati casi di clostridiosi in allevamento.

Figura 1



Figura 2



Fig.1. Edema del mesocolon. Contenuto di colore giallo e consistenza pastosa nel colon

Fig.1. Mesocolonic oedema. Colon filled with pasty yellowish faeces

Fig.2. Edema del mesocolon

Fig.2. Mesocolonic oedema

BIBLIOGRAFIA

Elschner M, Prudlo J, Hotzel H, Otto P, Sachse K. (2002) "Nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of group A rotaviruses". J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 49(2):77-81.

Yaeger M.J., Kinyon J.M., Songer J.G. (2007) "A prospective, case control study evaluating the association between Clostridium difficile toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions". J Vet Diagn Invest. 19(1):52-9.

Songer J.G. (2012) "Clostridiosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Scharz K.J., Stevenson W. "Diseases of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 714-715.

Songer J.G., Post K.W., Larson D.J., et al. (2000) "Infection of neonatal swine with Clostridium difficile". J Swine Health Prod. 8(4):185-189.

University of Minnesota New Rapid Semi-Quantitative RT-PCR Assay Developed to Detect Porcine Epidemic Diarrhea Virus. [accessed on 22 May 2017];2014 Available online:<https://www.cahfs.umn.edu/sites/cafhs.umn.edu/files/rt-pcr-assay-veterinay-diagnostic-lab.pdf>.

CASO CLINICO: FOCOLAIO DI ENTERITE DA ROTAVIRUS IN SUINETTI NEONATI

SALOGNI C.¹, COLZANI A.², GIOVANNINI S.¹, BONIOTTI B.¹, ALBORALI G.L.¹,

¹*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia;*

²*DVM, ADDCO Nutrition SpA, Castel Guelfo, Bologna*

INTRODUZIONE

Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere un caso di diarrea da Rotavirus nei suinetti responsabile di elevata mortalità e formazione di scarti in un allevamento da riproduzione sito in Lombardia. Al genere Rotavirus appartengono virus comunemente responsabili di diarrea negli animali della famiglia *Reoviridae* (virus nudi a doppia catena RNA). Il nome Rotavirus deriva dall'aspetto tipicamente a "ruota" dei virioni al microscopio elettronico. L'assenza di un envelope rende questi virus molto resistenti nel tempo (diversi mesi) e nell'ambiente all'azione dei disinfettanti (Zimmerman *et al.*, 2012). Esistono in base alle caratteristiche antigeniche almeno 9 sierogruppi (RVA, RVB, RVC, RVD, RVE, RVF, RVG, RVH e RVI) e diversi sierotipi in base alle proteine VP7 (27 sierotipi G) e VP4 (37 sierotipi P) per RVA. Tali proteine strutturali sono esterne e rappresentano antigeni inducenti anticorpi neutralizzanti. Il virus è caratterizzato da un elevato grado di riassortimento genico (Vlasova *et al.*, 2017). Tale fenomeno, noto soprattutto per il sierogruppo A, è stato recentemente evidenziato anche per RVB e C nel suino. Sebbene RVA rappresenti il 90% delle infezioni da Rotavirus nel suino e nell'uomo, altri sierogruppi come il RVB, RVC, RVE, RVH e RVI sono segnalati nei mammiferi (suino, bovino, ovino, roditori, pipistrelli ed insettivori). I sierogruppi RVD, RVF e RVG sono invece tipici del pollame (pollo e tacchino). La prevalenza dei sierogruppi e sierotipi è poi molto variabile sia da regione e regione sia durante l'anno (Malik *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2017). Per quanto riguarda l'Italia è stata evidenziata soprattutto la presenza di RVA (Martella *et al.*, 2001) con un ampio spettro di geni VP7 e VP4 sebbene siano presenti anche altri genotipi. RVB è stato invece segnalato molto più raramente a livello Europeo. RVE è presente storicamente in UK ma mancano dati attendibili sulla sua diffusione attuale. RVH è invece assente (Vlasova *et al.*, 2017). Il virus infetta gli enterociti (Zimmerman *et al.*, 2012), in modo particolare quelli maturi dell'apice del villo del tenue determinandone un accorciamento e una infiltrazione di mononucleati nella lamina propria. La diarrea è conseguente a fenomeni di malassorbimento dovuti all'infiammazione, alla distruzione degli enterociti e all'azione di sostanze vasoattive prodotte nelle cellule infette. Un ruolo determinante sarebbe dovuto dall'azione di una proteina virale non strutturale (NSP4) in grado di alterare la permeabilità delle cellule Ca²⁺-dipendenti. Tale effetto è dose ed età dipendente.

La malattia ha una trasmissione orizzontale per via oro-fecale. Sebbene i suini siano sensibili a tutte le età la frequenza maggiore si ha nei suinetti sotto le 6 settimane di vita, in modo particolare tra la 3a e 5a settimana. L'infezione nella prima settimana di vita è comunque possibile quando non vi sia una immunità passiva efficace. Sebbene si creda che l'infezione abbia una maggior incidenza invernale, nella realtà non si deve parlare di stagionalità ma di fluttuazioni spazio-temporali ed emergenza di certi genotipi. L'infezione si verifica a causa del decremento dell'immunità passiva colostrale, comparsa di sierotipi nuovi, introduzione di primipare non correttamente immunizzate, insufficiente produzione o ingestione di colostro oppure nel caso di contaminazione virale ambientale molto elevata (Vlasova *et al.*, 2017). La forma clinica è caratterizzata da una diarrea acquosa color giallo-biancastra che tende ad essere autolimitante se non intervengono infezioni complicanti batteriche o parassitarie. Anche una trascuratezza nella gestione ambientale e della cura del suinetto lattante incidono negativamente sull'andamento della malattia che normalmente

si aggira intorno al 20% per morbidità. La mortalità è in genere molto bassa ma i sopravvissuti hanno minori performances. La diagnosi della malattia viene fatta andando ad analizzare il contenuto dell'intestino tenue oppure le feci (Will *et al.*, 1994). L'esame può essere fatto in microscopia elettronica (immunoelettromicroscopia o colorazione negativa a goccia), ELISA oppure Real time PCR. La diagnosi differenziale va fatta con tutte forme virali intestinali da Coronavirus (PED, TGE) e le forme batteriche da *E. coli*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*, le parassitosi da *Isospora suis*.

DESCRIZIONE

L'episodio si è verificato nel 2017 in un allevamento da riproduzione (sito 1) di 4600 scrofe organizzato con parti in bande settimanali. Lo stato sanitario dell'allevamento è buono: stabile per PRRS ed indenne per Aujeszky. I suinetti sono vaccinati per *M. hyopneumoniae* e PCV2 in sala parto, all'arrivo in svezzamento non ricevono, di norma, nessun trattamento medicato. Prima della comparsa della patologia i risultati tecnici di quest'allevamento erano buoni : aborti inferiori al 1%, nati morti e mummificati intorno allo 0,5 % e perdite in sala parto intorno al 10 %. Verso l'inizio del mese Marzo del 2017 si è assistito ad un aumento dei casi di diarrea nei suinetti di una settimana di vita, che interessavano intere nidiata e refrattari ai trattamenti antibiotici. Tale problema interessava soprattutto le primipare. Come conseguenza anche la mortalità nei suinetti in sala-parto mostrava un netto aumento già nel primo quadrimestre (Tab. 1), considerando che nei mesi di Gennaio e Febbraio era invece rimasta nella media. Anche la percentuale di suinetti che arrivavano sottopeso allo svezzamento aumentava. Nei riproduttori non erano invece evidenti manifestazioni patologiche degne di nota.

Tabella 1. Mortalità in sala parto nel 2017.

Parametri	1° quadrimestre	2° quadrimestre	3° quadrimestre	4° quadrimestre	Media annua
% morti	15,1	21,0	19,1	21,6	19,2

In concomitanza con la comparsa dei primi casi di diarrea refrattaria ai trattamenti antibiotici routinari, sono stati sottoposti ad esame anatomopatologico e ad indagini di laboratorio 6 suinetti e 25 campioni di feci eseguiti a pool per nidiata. L'esame necroscopico è stato eseguito secondo metodiche standardizzate presso il laboratorio. Sulle feci e materiale patologico prelevato durante le autopsie sono state condotte indagini virologiche, batteriologiche e parassitologiche (Tab.2).

Tabella 2. Schema degli esami effettuati.

Matrice	ESAME
Polmone	RT-PCR PRRSV, influenza tipo A, Colturale batteriologico
Milza, rene	Colturale batteriologico
Intestino	Colturale batteriologico, ELISA Rotavirus tipo A, ME, RT-PCR PED, ELISA tox A e B di <i>Cl. difficile</i> , parassitologica per flottazione
Feci	colturale batteriologico, ELISA Rotavirus tipo A, ME, RT-PCR PED, parassitologica per flottazione.

L'esame anatomopatologico dei suinetti ha evidenziato lesioni ricorrenti, caratterizzate da: dimagrimento, disidratazione, imbrattamento della regione perianale con materiale fecale diarroico giallastro (Fig.1), enterite catarrale con assottigliamento e distensione delle anse per presenza di contenuto liquido color bianco-giallastro (Fig.2). Le indagini batteriologiche hanno rilevato la presenza di *E. coli* e *Cl. perfringens*. Per *E. coli* non sono stati evidenziati sierotipi particolari o ceppi caratterizzati da avere fattori di patogenicità (ETEC negativi) o particolari quadri di antibioticoresisteza. Anche la ricerca delle tossine di *Cl. difficile* ha dato esito negativo. Gli esami virologici (RT-PCR, ELISA e Immuno-elettronmicroscopia) hanno evidenziato la presenza di Rotavirus per tutti i pool intestinali o di feci analizzati. Non è stata riscontrata la presenza di Coronavirus (PEDv). La ricerca del PRRSV, virus influenzale tipo A e l'esame parassitologico per flottazione hanno dato esito negativo.

Figura 1. Suinetto con imbrattamento del perineo con feci diarroiche color giallastro



Figura 2. Quadro anatomopatologico caratterizzato da enterite catarrale



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel presente caso clinico è stato descritto un grave focolaio di diarrea neonatale, sostenuto da Rotavirus verificatosi in un allevamento intensivo da riproduzione situato in Lombardia. Il sospetto di Rotavirus è stato avanzato in base alla sintomatologia, alle lesioni anatomico-patologiche e successivamente confermato dagli esami di laboratorio. Un ruolo fondamentale ha avuto

tuttavia l'applicazione di un protocollo diagnostico che ha preso in considerazione sia agenti batterici che virali in grado di causare diarrea nel suinetto in lattazione. Tali agenti possono inoltre, se presenti in co-infezione, aggravare l'incidenza della malattia e quindi, in ultima analisi, essere considerati nell'attuazione di una profilassi e terapia adeguata.

In modo particolare nell'azienda considerata si è assistito ad un aumento della mortalità ma anche e soprattutto ad aumento degli scarti, che si è trascinato a lungo nonostante la terapia antibiotica intrapresa. Tuttavia l'immunizzazione delle scrofe gestanti tramite l'esposizione alle feci dei suinetti ammalati è in grado di contenere il problema a lungo termine. Dobbiamo infatti considerare che ad oggi non esistono presidi immunizzanti specifici autorizzati in Italia. La terapia di supporto tramite elettroliti somministrati per via intraperitoneale è in grado di contenere la disidratazione e la mortalità. Le misure di controllo sono mirate da un lato ad una riduzione della pressione dell'infezione tramite una accurata pulizia e disinfezione delle sale parto e dall'altro ad un aumento dell'immunità materna trasferita poi ai suinetti tramite il colostro.

BIBLIOGRAFIA

1. Y. S. Malik et al. (2014). **Rotavirus diarrhea in piglets: A review on epidemiology, genetic diversity and zoonotic risks.** The Indian journal of animal sciences 84(10):1035-1042 · October 2014.
2. V. Martella et al. (2001). **Genomic characterization of porcine rotaviruses in Italy.** Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 129–132.
3. A.N. Vlasova, J. O. Amimo and L. J. Saif (2017). **Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies.** Viruses, 2017 9, 48; www.mdpi.com/journal/viruses.
4. L. A. Will et al. (1994). **Evaluation of rotavirus infection and diarrhea in Iowa commercial pigs based on an epidemiologic study of a population represented by diagnostic laboratory cases.** J Vet Diagn Invest 6:416-422.
5. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. R. Kent, J. S. Gregory and W. Stevenson (2012). **Reovirus (Rotavirus and Reovirus) in Diseases Of Swine**, 10Th Edition,. John Wiley & Sons, Inc. 621-634. 893 pp.

PLEUROPOLMONITE FIBRINO-NECROTICO-EMORRAGICA IN SUINETTI SOTTOSCROFA

PANGALLO G¹., AMORICO A.², DE LORENZI G¹., GHERPELLI Y¹., BONILAUDI P¹.,
DOTTORI M.¹, L. GIBELLI¹ LUPPI A.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

²Gruppo Martini s.p.a

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è la descrizione di un caso di pleuropolmonite fibrino-necrotico emorragica da *Actinobacillus pleuropneumoniae* in suinetti sottoscrofa appartenenti ad un allevamento da riproduzione. L'esame anatomo-patologico eseguito su 2 suinetti deceduti improvvisamente senza segni clinici apparenti, ha permesso di evidenziare le lesioni tipiche a carico del parenchima polmonare, nel dettaglio si osservava un quadro di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica monolaterale. La diagnosi è stata confermata dall'esame batteriologico che ha permesso l'isolamento dai polmoni di un ceppo di *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 sierotipo 9 da tutti i suinetti conferiti.

Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) è un batterio cocco bacillare, Gram negativo e anaerobio facoltativo. Gli isolati di APP sono suddivisi in biotipo 1 e biotipo 2, in base alla loro dipendenza dal nicotinamide adenine dinucleotide (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). La specificità sierologica è conferita da polisaccaridi capsulari (CPS) e da lipopolisaccaridi di membrana (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 e APX III non è emolitica ma fortemente citotossica. Per quel che riguarda APX IV non è ancora chiaro il ruolo nella patogenesi della malattia, tuttavia sembrerebbe necessaria a completare l'espressione della virulenza del patogeno (Frey et al. 1994; Jansen et al., 1995). La trasmissione di APP può avvenire sia per contatto diretto sia tramite aerosol per brevi distanze. Negli allevamenti dove APP è endemico la trasmissione avviene generalmente tra scrofe infette e suinetti. Tale quadro è influenzato sia dalla quantità di batteri eliminati dalla scrofa che dal livello di immunità passiva nei suinetti (durata da 2 settimane a 2 mesi) acquisito tramite colostro. Determinanti per la perpetuazione e l'introduzione della patologia, infine, risultano essere i portatori sub-clinici. Nel suino, APP è causa di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica, anche se la gravità della malattia è determinata sia da fattori legati all'ospite e all'ambiente, sia dalla virulenza del ceppo coinvolto. Si possono osservare forme acute, sub-acute o croniche della malattia caratterizzate da morbidità e mortalità differenti. E' importante sottolineare come l'infezione da APP possa essere caratterizzata da forme sub-cliniche della malattia che si caratterizzano da bassa o assente mortalità, con frequente localizzazione tonsillare del patogeno o da forme clinicamente lievi con lesioni polmonari che frequentemente cronicizzano. In quest'ultimo caso si osservano, con elevata prevalenza in animali regolarmente macellati, pleuriti fibrose o croniche a localizzazione prevalentemente dorso-caudale.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico oggetto di questo lavoro si è verificato in una azienda da riproduzione a ciclo aperto (sito 1) di 987 scrofe a banda settimanale e a flusso continuo, positivo instabile per PRRS. Il piano vaccinale è riportato in Tabella 1.

SCROFE	
AUJESZKY	Ogni 4 mesi (3 interventi all'anno)
Swine Influenza Virus (SIV)	2 volte all'anno
PRRS	Ogni 3 mesi (4 interventi all'anno)
SUINETTI	
PRRS	A 18 giorni di vita
PCV2 + M. HYOPNEUMONIAE	A 24 giorni di vita

Tabella 1. Piano vaccinale di scrofe e suinetti.

Table 1. Vaccinations performed in sows and piglets.

I trattamenti farmacologici di routine, invece, sono riportati di seguito in Tabella 2.

TRATTAMENTI FARMACOLOGICI SUINETTI	
AMOXICILLINA	Alla castrazione (3gg di vita) e in concomitanza della vaccinazione PRRS

Tabella 2. Trattamenti antibiotici di routine nei suinetti.

Table 2. Routine antibiotic treatments in piglets.

A Maggio 2017 sono stati conferiti presso la Sezione di Reggio Emilia (IZSLER) 2 suinetti di circa 14 giorni di vita morti improvvisamente senza evidenti segni clinici. I soggetti facevano parte di una nidiata di 14 soggetti appartenenti ad una scrofa primipara. Nella stessa sala parto, in cui erano presenti i suinetti sopraccitati, sono stati interessati dalla problematica sanitaria gli animali, tutti figli di scrofette, appartenenti a 6 nidiata su 8. La morbilità registrata nel corso del focolaio è stata del 76.2%, mentre la mortalità ha raggiunto il 45.8%. L'esame necroscopico è stato eseguito seguendo procedure standardizzate. All'esame anatomo-patologico in un soggetto si poteva apprezzare un quadro di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica monolaterale diffusa e la presenza di rari filamenti di fibrina in addome, nell'altro, invece, era evidente una pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica monolaterale diffusa accompagnata da pericardite e lieve peritonite fibrinose. In entrambi i soggetti la superficie di taglio appariva emorragica con delle aree necrotiche di consistenza friabile. Tra le possibili diagnosi differenziali sono state considerate le lesioni causate da *Actinobacillus suis* e *Pasteurella multocida* "ceppi pleuritici". In sede autoptica sono stati prelevati campioni di polmone, rene e milza successivamente sottoposti ad esame batteriologico impiegando metodi standardizzati (semina su Ektoen agar, agar siero, agar globuli e agar sangue addizionato con NAD), e fissati in formalina tamponata al 10% per l'esame istopatologico. Le piastre seminate con materiale patologico da rene e milza sono state incubate a 37° C per 48 ore. Le piastre di agar sangue addizionato con NAD seminate con materiale proveniente dal polmone, invece, sono state incubate a 37° C per 48 ore in CO2 al 5-10%.

Dopo 24 ore d'incubazione si osservava la crescita di piccole colonie β-emolitiche su agar sangue addizionato con NAD su cui era stata eseguita la semina di materiale patologico proveniente dai polmoni e dai bronchi di entrambi i soggetti. La diagnosi batteriologica, basata sulla valutazione morfologica delle colonie è stata confermata dai test biochimici di

Catalasi, Ossidasi e Ureasi che hanno dato esito positivo.

Successivamente si è proceduto alla sieritipizzazione dei ceppi isolati attraverso il test di sieroagglutinazione rapida, impiegando una batteria di sieri policlonali. I test sopraccitati hanno permesso l'identificazione degli isolati di *Actinobacillus pleuropneumoniae* come appartenenti al biotipo 1 sierotipo 9.

L'esame microscopico ha messo in evidenza la presenza di pleuropolmonite fibrinosa con aggregati batterici negli alveoli e deplezione dei follicoli linfatici a livello splenico in entrambi i soggetti conferiti. Non erano presenti, infine, reperti microscopici di rilievo negli altri organi.

La suscettibilità del patogeno nei confronti di un pannello di molecole antibiotiche (Acido Nalidixico, 30µg; Gentamicina, 10 µg; Amoxicillina + Acido Clavulanico 20/10µg; Kanamicina 30 µg; Ampicillina, 10µg; Spectinomicina, 100 µg; Cefalotina, 30µg; Trimethoprim + Sulfonamidi, 1.25/23.75 µg; Ceftiofur, 30µg; Enrofloxacin, 5 µg; Florfenicolo, 30µg; Tetraciclina, 30 µg; Tiamulina, 30 µg; Tilmicosina, 15 µg) è stata testata mediante il metodo della disco diffusione (Test di Kirby – Bauer). I risultati del test di sensibilità, in accordo con i parametri interpretativi indicati nel documento CLSI M31-A3 (2008), ha evidenziato la sensibilità del ceppo di APP isolato a tutti gli antibiotici testati.

Nell'attesa degli esiti di laboratorio i suinetti sono stati trattati prima con amoxicillina e successivamente con florfenicolo (entrambi con dosaggio di 15mg/kg) con una riduzione, fino alla scomparsa, delle forme cliniche (in accordo con i risultati di sensibilità dell'antibiogramma). I suinetti sopravvissuti sono stati svezzati precocemente a 21 giorni essendo in atto il passaggio dalla banda settimanale a trisettimanale. Non sono state implementate misure di biosicurezza e di management nella gestione del caso. Non ci sono stati altri focolai successivi alla comparsa della problematica.

DISCUSSIONE

Il caso clinico presentato riguarda un focolaio di pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1 sierotipo 9 in suinetti sottoscrofa. Com'è noto, la pleuropolmonite è una patologia tipicamente descritta e diagnosticata in suini nella fase di accrescimento ed ingrasso. La precocità d'insorgenza del caso descritto potrebbe essere legata alla circolazione del virus della PRRSV nei suinetti sottoscrofa ed alla sua azione predisponente, anche di tipo immunodepressivo, ad infezioni batteriche. La deplezione linfocitaria a livello splenico, come evidenziato dall'esame istologico, parrebbe confermare questa ipotesi. Infatti, come riportato in letteratura scientifica, i macrofagi PRRSV-positivi modulano l'apoptosi dei linfociti T e B nei diversi organi linfatici, causando una deplezione linfoide sistemica (Gómez-Laguna et al., 2013). Un'altra condizione predisponente potrebbe essere la ridotta protezione conferita dal colostro dovuta all'ordine di parto delle scrofette (tutte primipare) (Carney-Hinkle et al., 2013) che non ha permesso un'adeguata ed efficace immunità passiva ai suinetti nei confronti di APP. Da considerare, inoltre, la patogenicità del ceppo isolato che, come riportato in letteratura, è generalmente associato alla tossina APX I, la quale risulta essere fortemente emolitica e citotossica (Jansen et al, 1995; Frey et al., 1994). Infine, per quanto concerne la mortalità riscontrata al momento del tatuaggio, sembra plausibile la riacutizzazione sintomatologica con conseguente aggravamento del quadro patologico preesistente dovuta alla situazione stressante che questa pratica induce nei suinetti. Un caso sovrapponibile a quello descritto è stato già osservato in Italia come riportato da Ustulin et al. (2017). Altri Autori riportano casi clinici simili ma generalmente in soggetti di età maggiore. In uno studio condotto da Chiers et al. nel 2002, ad esempio, è stata evidenziata la presenza di infezione in

soggetti a partire dalla quarta settimana di vita, mentre Vigre et al. (2002) hanno dimostrato la presenza di APP nelle tonsille di un suinetto di 11 giorni di vita con un aumento significativo degli animali positivi passando dalle 4 alle 12 settimane di vita.

La pleuropolmonite da APP è una patologia globale che può portare a notevoli perdite economiche in ambito zootecnico. La prevenzione della malattia riconosce sicuramente l'applicazione di misure di biosicurezza in grado di evitare l'introduzione del batterio in allevamento. E' auspicabile, soprattutto in allevamenti *naïve*, sottoporre gli animali da rimonta provenienti da altre aziende ad un periodo di quarantena e a controlli sierologici prima dell'arrivo. Durante un focolaio, un trattamento antibiotico mirato e adeguatamente supportato da esami di laboratorio (antibiogramma o MIC) unitamente ad una corretta gestione aziendale (adeguati livelli di benessere, tutto pieno-tutto vuoto, condizioni ambientali idonee) possono ridurre significativamente la mortalità. La vaccinazione, inoltre, costituisce un importante mezzo di prevenzione e controllo della malattia e viene generalmente praticata con l'impiego di vaccini commerciali appartenenti a diverse categorie (a corpo batterico, a sub-unità, combinati) in grado di conferire elevati livelli di protezione riducendo la mortalità, il numero dei trattamenti terapeutici e migliorando i parametri produttivi. Pur non essendo di uso comune, la vaccinazione delle scrofe e degli animali da rimonta prima della loro introduzione in azienda risulta essere una strategia di prevenzione efficace (Kristensen et al., 2004), mentre non è consigliabile vaccinare individualmente i suinetti sottoscrofa poiché l'efficacia del vaccino potrebbe essere influenzata dall'immunità colostrale.



BIBLIOGRAFIA

- Carney-Hinkle E. E. , H. Tran, J. W. Bundy, R. Moreno, P. S. Miller and T. E. Burkey. Effect of dam parity on litter performance, transfer of passive immunity, and progeny microbial ecology. Journal of Animal Science - Animal Production. Vol. 91 No. 6, p. 2885-2893
- Chiers K1, Donné E, Van Overbeke I, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Actinobacillus pleuropneumoniae* infections in closed swine herds: infection patterns and serological profile. Vet Microbiol. 2002 Apr 2;85(4):343-52.

- CLSI M31-A3: Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution Suceptibility Tests for Bacteria isolated From Animals; Approved Standards – Third Edition, vol. 28 n. 8, 2008.
- Gómez-Laguna J1, Salguero FJ, Fernández de Marco M, Barranco I, Rodríguez-Gómez IM, Quezada M, Carrasco L. Type 2 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus infection mediated apoptosis in B- and T-cell areas in lymphoid organs of experimentally infected pigs. Transbound Emerg Dis. 2013 Jun;60(3):273-8. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01338.x. Epub 2012 May 20.
- Martina Ustulin, Mirco Giorgiutti, Gabriella Conedera and Denis Vio. A case of mortality in suckling piglets due to pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Veterinary Record Case Reports 5: e000443. doi: 10.1136/vetreccr-2017-000443
- Vigre H, Angen 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. Vet Microbiol. 2002 Oct 22;89(2-3):151-9.

MORTALITÀ IMPROVVISA IN PRIMIPARE NEL POSTPARTUM

FUSCO L.¹, TROGU E.²

¹ libero professionista, Reggio Emilia, ² libero professionista, Milano.

INTRODUZIONE

Scopo del presente report è quello di descrivere un episodio di mortalità improvvisa che ha interessato tre primipare nel periodo del postpartum. In tutti i casi è stato possibile effettuare immediatamente la necropsopia, appurando che tutte le riproduttrici erano morte in seguito a torsione di un organo addominale: nei primi due casi lo stomaco, nel terzo il fegato. Il tasso di mortalità di ogni scrofaia può variare molto, ma raramente vengono effettuate necropsopie sui riproduttori deceduti. In bibliografia è possibile trovare studi che riportano risultati estremamente vari, ma in tutti nel postpartum vengono indicate tra le cause più frequenti di morte la cistite-pielonefrite, i prolassi rettale ed uterino e la sindrome MMA. La torsione degli organi addominali viene riportata con percentuali molto differenti tra loro, che vanno dallo 0,9% (Sanz et al., 2006), al 20,5% (Karg & Bilkei, 2002). Da uno studio che ha preso in esame 78 decessi in seguito a torsione si evince che gli organi maggiormente implicati sono nell'ordine: stomaco (45% dei casi), fegato e milza (21%) ed intestino (14%) (D'Allaire et al., 1991). L'aumento dei casi a partire dai primi anni 80 del secolo scorso potrebbe essere correlato ad un aumento della pressione produttiva alla quale sono sottoposte le scrofe (Morin et al., 1984); nel caso in esame è stato verosimilmente un problema gestionale a causare le torsioni e la morte almeno dei primi due soggetti.

DESCRIZIONE

Il caso clinico oggetto di questo lavoro si è verificato a cavallo tra i mesi di ottobre e novembre 2017 in una scrofaia costituita da 300 scrofe gestita in banda trisettimanale; le GP vengono acquistate esternamente, le F1 nascono in azienda e fecondate con seme interno. Il mangime viene prodotto dall'allevatore presso un mangimificio di proprietà in un altro sito poco distante e l'alimentazione viene somministrata in broda in tutte le fasi. La curva è stata impostata da un tecnico mangimista su indicazione della casa genetica. Nei mesi antecedenti il caso in oggetto si era osservato un aumento delle problematiche respiratorie nel post-svezzamento, mentre non si era evidenziato alcun sintomo tra i riproduttori. La mattina del 26/10/2017 in sala parto è stata rinvenuta deceduta una scrofa primipara al 21° giorno di lattazione. L'animale presentava addome notevolmente disteso, nonostante la morte fosse appena avvenuta. A distanza di un'ora è stata effettuata la necropsopia: all'apertura dell'addome si è avuta la fuoriuscita di un abnorme quantitativo di liquido misto a mangime ed una volta esposti i visceri è stato evidente che alimento era presente in tutta la cavità addominale. Andando ad esaminare lo stomaco si è evidenziata una torsione dello stesso e la presenza di una lacerazione dalla quale fuoriusciva ancora il mangime; l'organo era enormemente disteso. Nella tarda mattinata del giorno successivo durante il giro di controllo ci si è accorti che una scrofa primipara presentava forte dispnea e notevole distensione addominale. L'animale è stato fatto uscire dalla gabbia parto, ma dopo pochi minuti è deceduto. Anche in questo caso dopo un'ora è stata effettuata la necropsopia. L'addome era ulteriormente aumentato di volume dopo la morte, all'apertura della cavità addominale si è evidenziata una torsione dello stomaco che aveva causato la congestione dei vasi dell'organo e lo spostamento della milza in posizione centrale in addome. Inoltre vi era intensa iperemia dell'intestino nella sua totalità e presenza di materiale emorragico all'apertura del viscere. Lo stomaco era enormemente dilatato e conteneva una quantità abnorme di cibo. A nostro avviso

l'hemorrhagic bowel syndrome in questo caso è stata causata proprio dalla torsione dello stomaco, dal suo enorme aumento di volume e dal conseguente aumento di pressione intra-addominale che ha determinato la compressione del tronco venoso mesenterico. Un controllo effettuato sulle altre primipare presenti in sala parto ha evidenziato più di un animale che presentava lieve dilatazione addominale in assenza di sintomatologia clinica. Dopo una breve anamnesi ambientale si è giunti alla conclusione che il problema era stato causato dalla riduzione da tre a due del numero dei pasti giornalieri, motivata da un difetto sull'impianto che causava la distribuzione, in alcune calate, quasi esclusivamente di acqua; in attesa di una risoluzione da parte della ditta costruttrice si era cercato di tamponare il problema portando a due i pasti giornalieri somministrati in lattazione. La settimana successiva in un'altra sala parto, separata dalle precedenti e dove l'alimentazione è somministrata manualmente, è stata rinvenuta una terza scrofa primipara deceduta. In questo caso non era presente distensione addominale e l'esame autoptico ha evidenziato all'apertura dell'addome una considerevole quantità di sangue e colorito rossastro di tutti gli organi dovuto a imbibizione emoglobinica. L'emorragia era stata causata da una rottura del fegato, a sua volta determinata dalla torsione dell'organo stesso nella porzione mediale.

Figura 1. Dall'alto in senso orario: carcassa del primo soggetto deceduto con evidente dilatazione dell'addome; rottura dello stomaco; visione dei visceri addominali.



Figura 2. In alto da sinistra: aspetto degli organi addominali del secondo soggetto e fuoriuscita di cibo all'apertura dello stomaco; in basso da sinistra rottura del lobo epatico ed aspetto del fegato nel suo insieme.



DISCUSSIONE

La percentuale di mortalità dei riproduttori raggiunge valori che possono essere estremamente differenti tra le varie scrofaie. Spesso la morte dei soggetti non viene indagata a livello anatomopatologico, sia per problematiche di tempo che per la difficoltà ad effettuare la necropsia su suini adulti. In bibliografia vengono riportate varie cause di morte, generalmente riconducibili a patologie direttamente legate al puerperio e riferite all'apparato urogenitale. Ciononostante soprattutto in determinate genetiche iperprolifiche viene inserita tra le altre anche la torsione di uno o più organi addominali. Vari fattori possono intervenire scatenando episodi di torsione, ma indubbiamente il principale è un'errata gestione dei pasti, con un numero degli stessi, e conseguentemente un volume di cibo, inadeguati alla capacità ingestiva dei soggetti. Nel nostro caso dovendo tamponare un problema sull'impianto di distribuzione si era ridotto a due il numero dei pasti, con un logico aumento del volume fornito agli animali. Mentre i soggetti pluripari riuscivano a gestire pasti tanto abbondanti, le primipare non erano evidentemente in grado di sopportare un tale volume di cibo. Il primo soggetto è infatti deceduto due giorni dopo la variazione dei pasti ed il secondo il giorno successivo. Subito dopo la seconda necropsia il controllo sulle altre scrofe di primo parto ha evidenziato sul resto dei soggetti la presenza di distensione addominale, seppur lieve. Abbiamo quindi compreso la causa scatenante la problematica ed immediatamente abbiamo riportato a tre il numero delle somministrazioni, andando ad integrare con il secco il pasto delle calate dove la distribuzione non era ottimale. In questo modo la problematica è immediatamente rientrata

e non vi sono stati casi successivi. La morte della terza primipara non è invece riconducibile ad un errore gestionale, ma abbiamo deciso di introdurla nel report in oggetto perché ci è sembrato interessante come anche questo decesso fosse stato causato da una torsione di un organo addominale, problematica che non era mai stata osservata nell'azienda in oggetto. A tal proposito un quesito che ci siamo posti è se il miglioramento notevole nel numero totale di nati di alcune genetiche, che erano sempre state piuttosto rustiche, non abbia aumentato contemporaneamente la sensibilità delle stesse ai fattori stressanti di origine gestionale, che in passato era appannaggio soprattutto delle genetiche iperprolifiche come la danese. Ad oggi non abbiamo alcuna risposta, anche perché nella nostra esperienza quotidiana non abbiamo avuto più episodi di mortalità da poter indagare nei riproduttori.

BIBLIOGRAFIA

Sanz M, Roberts JD, Perfumo CJ, et al. Assessment of sow mortality in a large herd. J Swine Health Prod. 2007;15(1):30–36.

Karg H1, Bilkei G. Causes of sow mortality in Hungarian indoor and outdoor pig production units. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 2002 Sep-Oct;115(9-10):366-8.

Sylvie D'Allaire, Richard Drolet, Madeleine Chagnon. The causes of sow mortality: A retrospective study. Can Vet J 1991; 32: 241-243.

M. Morin, R. Sauvageau, J.-B. Phaneuf, E. Teuscher, M. Beauregard, A. Lagacé. Torsion of Abdominal Organs in Sows: A Report of 36 Cases. Can Vet J 1984; 25: 440-442.

**PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2018
VINCITORE**

**VALIDAZIONE ED APPLICAZIONE DI UN PROTOCOLLO
BASATO SU DIRECT PCR PER LA RICERCA DI MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE E PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3**

***VALIDATION AND APPLICATION OF A DIRECT PCR PROTOCOL
FOR THE DETECTION OF MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE
AND PORCINE CIRCOVIRUS TYPE 3***

LEGNARDI, M., FRANZO, G., CECCHINATO, M., TUCCIARONE, C. M.,
DRIGO, M.

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) - Università di Padova

Parole chiave: *Porcine circovirus type 3; Mycoplasma hyopneumoniae; direct PCR;*

Key words: *Porcine circovirus type 3; Mycoplasma hyopneumoniae; direct PCR;*

Riassunto: Una metodica basata su *direct PCR*, in grado di garantire l'amplificazione di DNA direttamente a partire da campioni non purificati, è stata validata per la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3). I microorganismi scelti rappresentano due realtà epidemiologiche profondamente diverse: mentre il primo è un batterio a tropismo respiratorio storicamente responsabile di gravi danni economici per la produzione suinicola mondiale e la cui letteratura in merito è molto ampia, PCV3 è un virus di recentissima scoperta, ancora poco conosciuto ma caratterizzato da molti punti di contatto con il ben più noto *Porcine circovirus type 2* (PCV2), uno dei patogeni più rilevanti ad affliggere il settore.

La validazione dei rispettivi protocolli ha fornito un utile strumento per lo svolgimento di analisi molecolari fortemente vantaggiose sia a livello di tempo che di costi, il tutto garantendo alte prestazioni diagnostiche in termini di specificità, sensibilità e ripetibilità. L'applicazione della metodica in un contesto di campo ha inoltre permesso di estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia di Mhyo e PCV3, in particolare inerenti la loro circolazione nel territorio italiano, il fenomeno delle coinfezioni, la loro eventuale associazione con determinati sintomi clinici e lesioni, le matrici nelle quali è possibile rinvenirli e le categorie produttive che risultano più colpite. Se per quanto riguarda Mhyo le informazioni raccolte non fanno che confermare dati pregressi, le indicazioni tratte in merito a PCV3, *in primis* quelle relative alla sua presenza in Italia, gettano promettenti basi per futuri studi atti a determinare l'esatto ruolo epidemiologico di questo microorganismo emergente.

Abstract: A *direct PCR*-based protocol allowing DNA amplification from unpurified samples has been validated to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) and *Porcine circovirus type 3* (PCV3). These two microorganisms represent radically different epidemiological situation: while the first is a well-known respiratory bacterial pathogen, which accounts for huge economic losses, PCV3 is a newly discovered and still obscure virus sharing some similarities with the infamous *Porcine circovirus type 2* (PCV2), one of the most devastating pathogens afflicting the pig industry.

The assay validation has provided a useful tool to perform quick and cost-effective molecular analyses featured by high sensibility, sensitivity and repeatability.

After validation, the two protocols have been applied to investigate Italian field samples, thus providing several data on the epidemiology of PCV3 and Mhyo, especially regarding their circulation, distribution in different age groups, possible association with clinical symptoms and necropsy findings, detection in diverse diagnostic matrices and coinfections with other pathogens.

The data collected on Mhyo mostly agree with the vast already available literature. On the other hand, the information gathered on PCV3 give useful insights into its largely unknown epidemiology and lay the foundations for future works that will be necessary to clarify the exact pathogenetic role of this emerging microorganism.

INTRODUZIONE

L'industria suinicola rappresenta il settore leader nella produzione di carne a livello mondiale, europeo ed italiano (<http://www.fao.org/faostat>). Essa è in rapida e costante espansione (anche e soprattutto nei paesi in via di sviluppo) ed è caratterizzata da sistemi produttivi marcatamente intensivi ed elevati livelli tecnologici, oltre che da una grande mole di scambi internazionali. Nonostante nei paesi sviluppati l'applicazione di misure di biosicurezza sia una pratica comune, i danni economici causati dalle malattie infettive sono devastanti e si riscontra un numero allarmante di patologie emergenti (Fournié et al., 2015). Le alte densità di popolazione e l'omogeneità genetica tipica del suino offrono un substrato ideale per la selezione di agenti virali spiccatamente patogeni e ospite-specifici, spesso responsabili di epidemie su larghissima scala (Drew, 2011) è il caso ad esempio di *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus* (PRRSV) e di *Porcine circovirus type 2* (PCV2).

In un simile contesto, i saggi basati sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) rappresentano un ausilio diagnostico di inestimabile importanza, al tempo stesso performante e di facile applicazione nella pratica laboratoristica quotidiana. Nel corso degli ultimi 25 anni, la PCR classica e le sue varianti (come PCR *multiplex* e *nested*, ma soprattutto la PCR *real-time*) si sono affermate, grazie alla loro elevata sensibilità, come le metodiche molecolari di scelta in una grande varietà di ambiti di competenza veterinaria, non limitati strettamente alla sanità animale ma con implicazioni anche per la salute umana (basti pensare all'igiene degli alimenti ed alle zoonosi). Tra i più recenti sviluppi in tal senso figura la *direct PCR*, la quale permette l'amplificazione del DNA a partire direttamente dal campione, non richiedendo una fase preliminare di estrazione dell'acido nucleico e garantendo nel contempo buone prestazioni e un significativo risparmio a livello economico e di tempo necessario per lo svolgimento delle analisi.

L'obiettivo primario di questo progetto è stato la validazione di protocolli basati su *direct PCR* per la ricerca di patogeni rilevanti in ambito suinicolo. La scelta dei microorganismi da studiare è ricaduta su *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo) e *Porcine circovirus type 3* (PCV3), ritenuti rappresentativi di due situazioni epidemiologiche notevolmente differenti.

Mhyo è un eubatterio appartenente alla classe *Mollicutes*, ordine *Mycoplasmatales*, famiglia *Mycoplasmataceae*. Si tratta di un patogeno strettamente ospite-specifico che rappresenta l'agente eziologico principale della polmonite enzootica, un'affezione respiratoria del suino diffusa a livello mondiale e caratterizzata da andamento cronico, eziologia multifattoriale, alta morbilità e bassa mortalità (Thacker and Minion, 2012). Sebbene possa colpire suini di tutte le età, essa è difficilmente osservata in individui sotto le 6 settimane di vita. I sintomi includono una tosse secca non produttiva cronica, una riduzione dell'accrescimento giornaliero ed un peggioramento dell'indice di conversione alimentare; in forme complicate si possono aggiungere piressia, dispnea, prostrazione e anoressia, con esiti talvolta mortali (Maes et al., 1996): Mhyo è infatti considerato un vero e proprio "door-opener" per un gran numero di patogeni secondari, tra i quali figurano *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* e *Arcanobacter pyogenes* (Thacker and Minion, 2012). Mhyo gioca inoltre un ruolo chiave nel complesso delle malattie respiratorie del suino (PRDC), il quale colpisce tipicamente i soggetti in accrescimento ed in finissaggio causando tosse, dispnea, anoressia, febbre e riduzione dell'accrescimento giornaliero (Chae, 2016; Sibila et al., 2009). Mhyo è quindi responsabile di ingenti perdite economiche per la suinicoltura mondiale, adducibili principalmente ad uno scadimento delle prestazioni produttive, oltre che a maggiori costi veterinari ed in rari casi ad un aumento del tasso di mortalità

(Maes et al., 1998). Le attuali misure adottate per controllare la polmonite enzootica, che consistono solitamente nel combinare un management ottimale all'uso di antimicrobici ed alla vaccinazione, non sono considerate in grado di debellare la malattia, per quanto i benefici a livello economico siano indubbi (Simionatto et al., 2013).

Se quindi la centralità di Mhyo nell'eziopatogenesi delle affezioni respiratorie del suino ed il suo conseguente impatto economico sul settore sono ben documentate, profondamente diverso è il caso di PCV3, la cui scoperta, avvenuta per mezzo di analisi metagenomiche, è recentissima (Palinski et al., 2017). Si tratta della terza specie appartenente al genere *Circovirus* (Figura 1) in grado di infettare il suino dopo *Porcine circovirus type 1* (PCV1) e PCV2. Mentre l'importanza dell'apato geno PCV1 è marginale (Puvanendiran et al., 2011; Tombácz et al., 2014) a partire dagli anni '90 PCV2 è emerso come uno dei principali patogeni ad affliggere la produzione suinicola mondiale, causa di ingentissime perdite economiche dovute ad un complesso di malattie descritte collettivamente come *Porcine circovirus associated disease* (PCVAD) (Alarcon et al., 2013; Meng, 2012). Per quanto riguarda PCV3, le conoscenze sulla sua epidemiologia sono ancora limitate. Descritto sinora in Cina (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Shen et al., 2017) Stati Uniti (Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016) Corea (Kwon et al., 2017) e Polonia (Stadejek et al., 2017) questo virus è già stato associato a diverse manifestazioni cliniche tra cui disordini riproduttivi, miocarditi, infiammazioni multisistemiche, sindromi dermatite-nefrite e respiratorie, anche se non è ancora stato chiarito il suo esatto ruolo patogenetico, sia esso presente da solo o in coinfezione (Fan et al., 2017; Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Shen et al., 2017). Per questi motivi, e soprattutto per via dei molti punti di contatto con il ben più noto PCV2, l'importanza epidemiologica di PCV3 è potenzialmente notevole ma ancora tutta da provare: risulta in tal senso evidente la necessità di strumenti diagnostici al contempo performanti e di facile accessibilità, a cui si è per l'appunto cercato di rispondere con questo progetto.

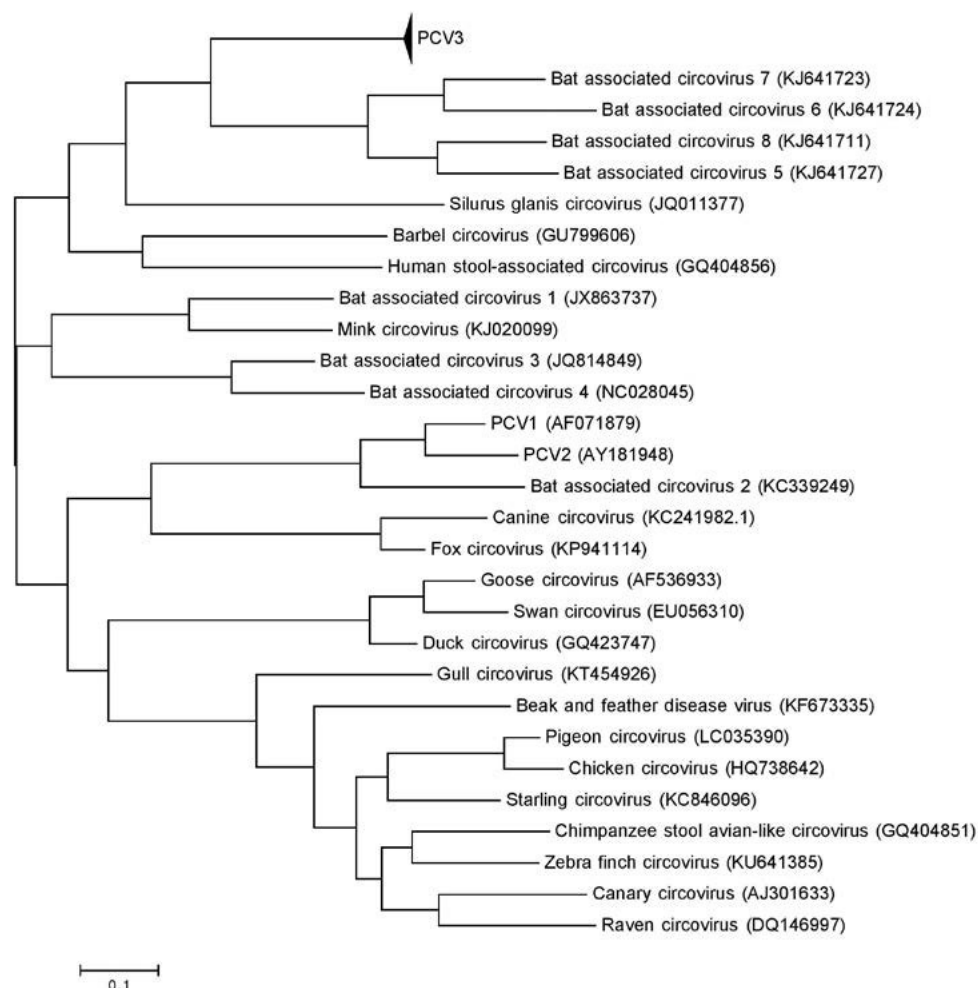


Figura 1. Albero filogenetico del genere *Circovirus*, costruito applicando l'approccio di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei ed implementato nel software MEGA7 (Kumar et al., 2016). L'allineamento di partenza è stato ottenuto utilizzando il programma MAFFT (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>) su sequenze preprocessate con il tool *Cyclic DNA Sequence Aligner* (<http://kdbio.inesc-id.pt/~csa/index.php>).

Figure 1. Phylogenetic tree of the *Circovirus* genus, built using the *Maximum Likelihood* method, based on Tamura-Nei model, as implemented in MEGA7 software (Kumar et al., 2016). The starting alignment was obtained with MAFFT software (<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/#ref>) starting from sequences that were preprocessed with *Cyclic Dna Sequence Aligner* tool (<http://kdbio.inesc-id.pt/~csa/index.php>).

A validazione avvenuta, il passo successivo è consistito nell'effettiva applicazione del protocollo su campioni provenienti da diverse realtà suinicole italiane. Se da una parte la natura dei suddetti campioni, non prelevati appositamente ma provenienti da studi precedenti e già rivelatisi positivi nei confronti di altri patogeni respiratori (PRRS e PCV2 *in primis*), non ha permesso di trarre conclusioni sulla prevalenza dei microrganismi, dall'altra ciò ha consentito di estrapolare utili dati in merito al fenomeno delle coinfezioni, le quali giocano un ruolo determinante nelle meccaniche patogenetiche di Mhyo e la cui importanza per quanto riguarda PCV3 necessita di essere chiarita con ulteriori ricerche. Un'ulteriore ragione di grande interesse era rappresentata dalla possibilità di attestare la presenza di PCV3 sul territorio italiano. Tra gli aspetti indagati figurano anche la frequenza di PCV3 e Mhyo nelle diverse categorie produttive, i sintomi e le lesioni necroscopiche a cui sono associati, la loro diffusione nel Norditalia e i materiali biologici in cui possono essere ritrovati.

MATERIALI E METODI

Non essendo ad oggi disponibile nessun isolato di PCV3, come controllo positivo è stato utilizzato un plasmide sintetico contenente l'intera sequenza del virus, gentilmente concessa dal prof. Hause (Kansas State University). Nel dettaglio, il genoma completo di PCV3 è stato fatto sintetizzare chimicamente e clonare in un plasmide vettore (pUC57-Kan Vector) da una ditta specializzata (GenScript). Con il costrutto così ottenuto sono stati trasformati degli *E. coli* Top10 competenti (Invitrogen). Al fine di ottenere un controllo che emulasse la presenza del virus all'interno delle cellule dei tessuti animali, una sospensione contenente 10^5 *E. coli*/mL è stata ulteriormente diluita 1:100 in una matrice ottenuta dall'omogeneizzazione di polmone suino in PBS. Il controllo positivo di Mhyo è stato cortesemente fornito dal dottor Catania dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Diverse coppie di *primer* sono state disegnate utilizzando il programma *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), per poi selezionare quelle più performanti attraverso prove sperimentali. La specificità degli oligonucleotidi è stata preliminarmente valutata mediante *Primerblast* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), mentre l'impiego del software *OligoAnalyzer 3.1* (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ha permesso di accertare che la complementarietà fra i *primer* fosse bassa, scongiurando così l'insorgere di problemi legati alla struttura secondaria come la formazione di *hairpin*, omoed eterodimeri. Particolare attenzione è stata posta alla posizione di *annealing* dei primer di PCV3, per fare in modo che corrispondesse alla regione codificante la proteina *Rep*, in quanto molto conservata (Rosario et al., 2017).

I dati relativi ai primer sono elencati in Tabella 1.

PRIMER	SEQUENZA	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
Mhyo forward	5'-AACAAATATGGAGAATTGGTCGGAAG-3'	453 bp
Mhyo reverse	5'-CCCCTAATTAAATTTGGGACGTG-3'	
PCV3 forward	5'-AAAGCCCCGAAACACAGGTGGTGT-3'	510 bp
PCV3 reverse	5'-TTTTCCCGCATCCTGGAGGACCAAT-3'	

Tabella 1. Primer utilizzati per l'amplificazione di Mhyo e PCV3.

Table 1. Primers used to amplify Mhyo and PCV3.

La lunghezza degli amplificati così ottenuti, rispettivamente di 510 bp per PCV3 e di 453 bp per Mhyo, è stata scelta con l'obiettivo di ottenere un compromesso tra l'efficienza della reazione di PCR e la possibilità di svolgere sequenziamenti che risultassero informativi.

Per l'amplificazione è stato utilizzato il kit *Phire™ Animal Tissue Direct PCR* (Thermo Scientific), il quale può essere impiegato seguendo due diversi protocolli, uno diretto che prevede la sola reazione di PCR ed uno in cui prima della PCR il campione viene diluito e sottoposto ad una preprocessazione atta a liberare il DNA dal tessuto. Sebbene la seconda soluzione vada in parte a limitare i vantaggi garantiti dalla *direct PCR* in termini di tempo necessario per svolgere le analisi, si è scelto quest'ultimo approccio (seppur con qualche modifica rispetto alle istruzio-

ni fornite dalla ditta produttrice) in quanto consigliato nel caso si abbia a che fare con *primer* e tipi di campioni non precedentemente testati, come per l'appunto in questo studio. Le aliquote preprocessate sono state stoccate a -20 °C.

Tutte le reazioni sono state svolte con un termociclatore 2720 *Thermal Cycler*[®] (Applied Biosystems).

I prodotti di PCR, dopo l'aggiunta di un addensante (*DNA Loading Dye*[®]; Thermo Scientific), sono stati caricati su gel di agarosio 2% addizionato con *EuroSafe Nucleic Acid Staining Solution*[®] (EuroClone S.p.A.). La specificità delle bande è stata valutata tramite il confronto con *GeneRuler 100bp DNA Ladder*[®] (Thermo Scientific), una miscela di frammenti di DNA di peso molecolare e concentrazione noti, caricati assieme ai campioni sperimentali. La corsa elettroforetica ha previsto l'applicazione di una differenza di potenziale pari a 100V per 30 minuti. Il gel è stato quindi analizzato con un transilluminatore *Gel Doc XR System*[®] (BioRad) e visualizzato con *Image Lab*[™] Software (Bio-Rad).

La fase di effettiva analisi dei campioni è stata preceduta dalla validazione dei protocolli da utilizzare. Dopo aver testato numerose impostazioni differenti a livello termico e di concentrazione di reagenti e campioni, sono stati definiti due protocolli distinti per PCV3 e Mhyo capaci di garantire prestazioni ottimali.

La sensibilità analitica di ciascun metodo è stata definita effettuando delle diluizioni seriali in base 10 di controlli positivi a titolo noto e testandole con i protocolli validati. Le performance diagnostiche dei protocolli basati su *direct PCR* sono state comparate con quelle dei loro analoghi applicati dopo estrazione del DNA con metodi tradizionali.

La specificità dei due saggi è stata valutata testando sia ceppi di referenza di altri patogeni sia campioni diagnostici risultati positivi a numerosi altri patogeni con genoma a DNA, ed in particolare: PCV1, PCV2, *Porcine parvovirus 1*, *Porcine parvovirus 2*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Corinebacterium pyogenes* e *Bordetella bronchiseptica*.

La ripetibilità è stata determinata testando sei replicati di tre diverse diluizioni di ciascun controllo positivo in 3 corse indipendenti.

Una volta ultimata la validazione, si è proceduto conducendo la ricerca di Mhyo e PCV3 su un totale di 120 campioni precedentemente risultati positivi per altri patogeni (respiratori e non) durante la routinaria attività diagnostica condotta da un'importante filiera produttiva del Nord Italia all'interno delle sue aziende. I campioni, conservati a -80°C, risultavano prelevati tra il 2014 ed il 2017 tra Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Piemonte e Friuli-Venezia Giulia (Figura 2), in 55 allevamenti appartenenti a diverse fasi di una filiera multisito, ed erano quindi rappresentativi di diverse categorie produttive.



Figura 2. Distribuzione geografica degli allevamenti da cui sono stati prelevati i campioni.
Figure 2. Geographic distribution of the sampled farms.

Brevemente, i campioni inclusi nello studio comprendevano: tessuto polmonare, placentare e fetale (in caso di episodi di aborto), *pool* di diversi organi, sangue, fluido orale, tamponi nasali, raschiati orofaringei e spugnette (utilizzate per il campionamento delle superfici degli automezzi per il trasporto animali).

I campioni si dividevano tra quelli prelevati nell'ambito della routinaria attività di autocontrollo, per i quali non erano disponibili dati anamnestici precisi, ed altri prelevati ai fini dello svolgimento di approfondimenti diagnostici in presenza di sospetti clinici: in questo secondo caso è stato possibile risalire alle informazioni relative alla sintomatologia clinica ed ai reperti anatomopatologici rinvenuti all'eventuale necropsopia.

Per la catalogazione dei campioni, degli esiti delle analisi condotte e dei dati già disponibili si è predisposto un database in Microsoft[®] Excel[®] contenente le seguenti voci:

- Identificativo del campione;
- Anno di raccolta;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio dei campioni;
- Identificativo della scatola per lo stoccaggio degli estratti;
- Risultato della PCR per la ricerca di Mhyo;
- Risultato della PCR per la ricerca di PCV3;
- Tipo di matrice del campione;
- Allevamento in cui è stato prelevato il campione;
- Comune dell'allevamento;
- Categoria produttiva dell'animale;
- Età dell'animale;
- Motivo del prelievo, se previsto all'interno di un piano di controllo routinario o effettuata sulla base di un sospetto clinico; nel secondo caso la sintomatologia è stata classificata in respiratoria, riproduttiva e sistemica (mortalità compresa);
- Presenza o meno di reperti necroscopici;
- Esiti degli esami per la ricerca di PRRSV (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di PCV2 (se disponibili);
- Quantificazione del titolo virale di PCV2;
- Esiti degli esami per la ricerca di *Swine influenza virus* (SIV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Streptococcus suis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Mycoplasma hyorhinis* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Actinobacillus pleuropneumoniae* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Corinebacterium pyogenes* (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Porcine epidemic diarrhoea virus* (PEDV) (se disponibili);
- Esiti degli esami per la ricerca di *Bordetella bronchiseptica* (se disponibili);

L'analisi statistica dei dati ottenuti ha previsto l'impiego dei software *R* (*R Core Team, 2016*) e Microsoft[®] Excel[®]. Per tutti i test eseguiti, il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0,05$.

RISULTATI

Le numerose prove sperimentali effettuate hanno permesso di definire due protocolli distinti per la ricerca di *Porcine circovirus type 3* (PCV3) e *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo), caratterizzati da elevata efficienza di reazione.

Una prima parte, comune ai due protocolli, prevede l'aggiunta di 20 ml di *Dilution Buffer* e 0,5 ml di *DNARelease Additive* a 2 ml di ciascun campione, la centrifugazione e l'incubazione per 5 minuti a 25 °C e per i successivi 4 minuti a 98 °C. 2 ml di questa soluzione, vengono addizionati ad una mix di reazione composta da *Phire Animal Tissue PCR Buffer 1x*, 0,6 mM di ciascun *primer*, 0,42 ml di *Phire Hot Start II DNA Polymerase* e acqua da biologia molecolare fino ad un volume finale di 20 ml.

A questo punto i protocolli termici differiscono, come illustrato in Tabella 2.

	MHYO	PCV3
INCUBAZIONE	98°C per 5'	98°C per 5'
DENATURAZIONE	98°C per 5"	98°C per 5"
ANNEALING	63°C per 7"	68°C per 7"
ESTENSIONE	72°C per 20"	72°C per 15"
NUMERO DI CICLI	45	45
ESTENSIONE FINALE	72°C per 1'	72°C per 1'

Tabella 2. Protocolli di PCR utilizzati per Mhyo e PCV3.
Table 2. PCR protocols used to amplify Mhyo and PCV3.

La sensibilità analitica si è rivelata essere pari a 6,24 copie/ml per PCV3 e 4,67 ucc/ml nel caso di Mhyo, mentre il confronto dei protocolli validati con metodiche molecolari tradizionali ha permesso di dimostrarne l’identica sensibilità analitica. La specificità è stata invece confermata testando ceppi di referenza di diversi patogeni. In aggiunta, molti dei campioni diagnostici analizzati, pur essendo positivi nei confronti di altri microrganismi con genomi a DNA, non sono risultati positivi per Mhyo e PCV3. In una decina di campioni era inoltre già stata effettuata la ricerca di Mhyo, con risultati rivelatisi analoghi. Ad ulteriore conferma della specificità dei protocolli, il sequenziamento di due campioni trovati positivi (rispettivamente 3436 per Mhyo e 32941 per PCV3) ha dimostrato l’effettiva presenza dei microrganismi ricercati. Le svariate prove condotte per determinare la ripetibilità dei due saggi hanno prodotto esiti concordanti nella totalità dei casi per entrambi i protocolli. Le indagini diagnostiche eseguite su campioni a provenienza nota hanno permesso di ricavare una buona quantità di informazioni sull’epidemiologia dei microorganismi presi in esame. Tra i 120 campioni analizzati, 36 sono risultati positivi per PCV3 e 21 per Mhyo. In 16 dei 55 allevamenti presi in considerazione è stato ritrovato Mhyo (Figura 3), mentre quelli interessati dalla presenza di PCV3 si sono rivelati 26 (Figura 4).



Figura 3. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di Mhyo
Figure 3. Geographic distribution of Mhyo positivities.

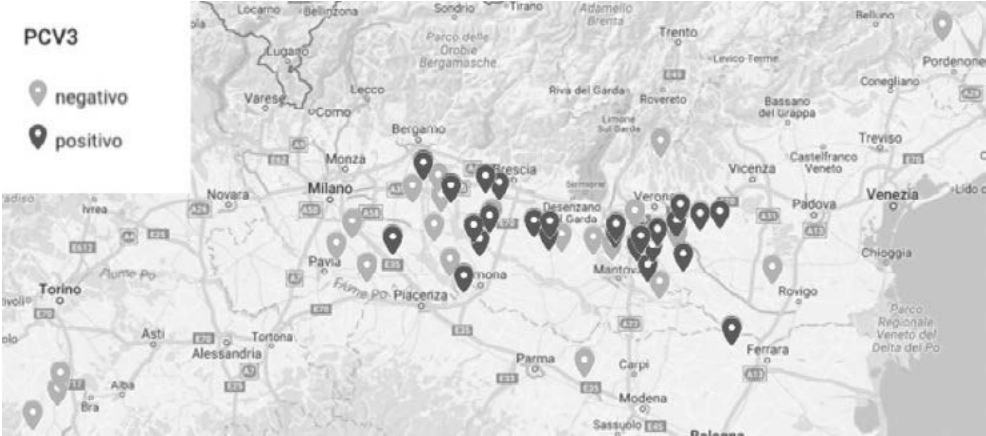


Figura 4. Distribuzione geografica dei ritrovamenti di PCV3.
Figure 4. Geographic distribution of PCV3 positivities.

La distribuzione delle positività per Mhyo e PCV3 nelle diverse categorie produttive è illustrata nelle Figure 5 e 6, rispettivamente.

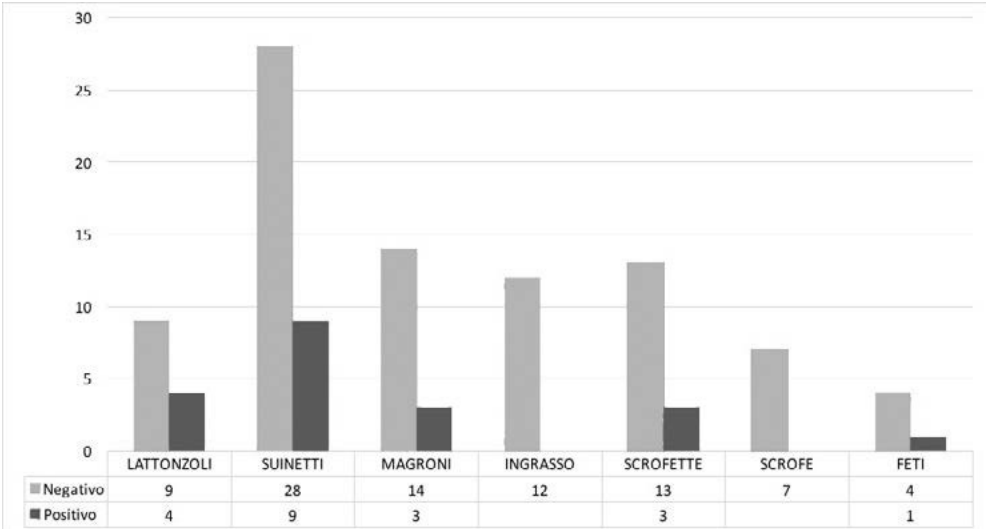


Figura 5. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di Mhyo divisi per categoria produttiva.
Figure 5. Mhyo test results count classified according to the different productive categories.

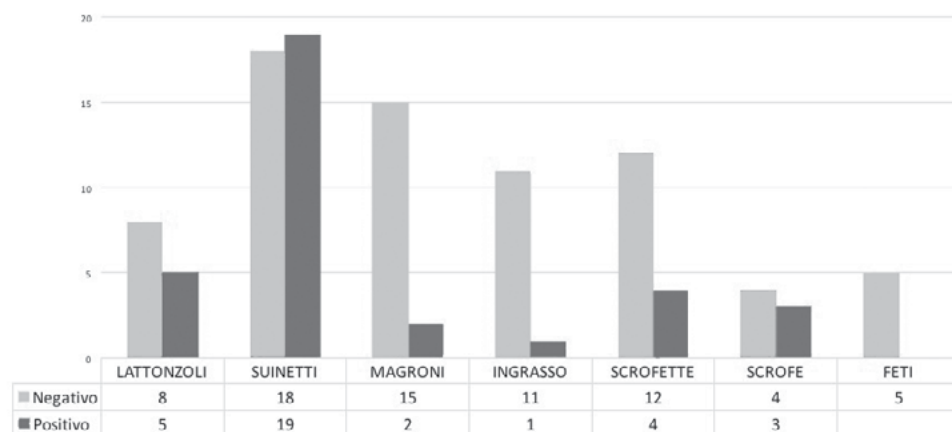


Figura 6. Conteggio degli esiti degli esami per la ricerca di PCV3 divisi per la categoria produttiva.

Figure 6. PCV3 test results count classified according to the different productive categories.

Mhyo è stato ritrovato nelle seguenti matrici: pool di organi (8/29), siero (6/33), tessuto polmonare (4/39), fluido orale (2/8) e feti abortiti (1/2).

Il rinvenimento di PCV3 è avvenuto a partire da tessuto polmonare (17/39), pool di organi (10/29), sieri (6/33), fluido orale (2/8) e tamponi nasali (1/3).

Tutte le spugnette (4 in totale), l'unica placenta e il singolo raschiato orofaringeo testati si sono rivelati negativi per entrambi i patogeni.

Mhyo è stato ritrovato in coinfezione con PCV3, PRRSV, PCV2, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis* e *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Figura 7). Nessuno dei campioni positivi per Mhyo era stato sottoposto alla ricerca di *Corinebacterium pyogenes*, PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

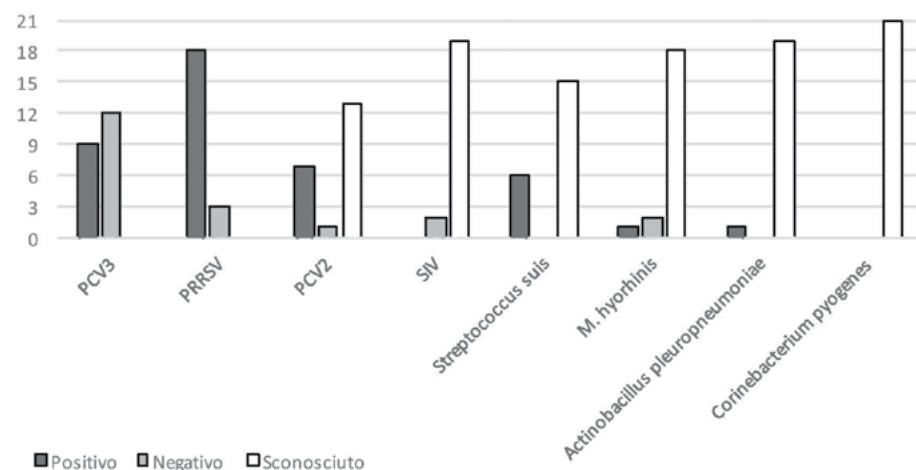


Figura 7. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di Mhyo.

Figure 7. Count of test results for different pathogens in Mhyo-positive samples.

PCV3 è stato ritrovato in coinfezione con Mhyo, PRRSV, PCV2, SIV, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Corinebacterium pyogenes* (Figura 8). In nessuno dei campioni positivi per PCV3 erano stati ricercati PEDV e *Bordetella bronchiseptica*.

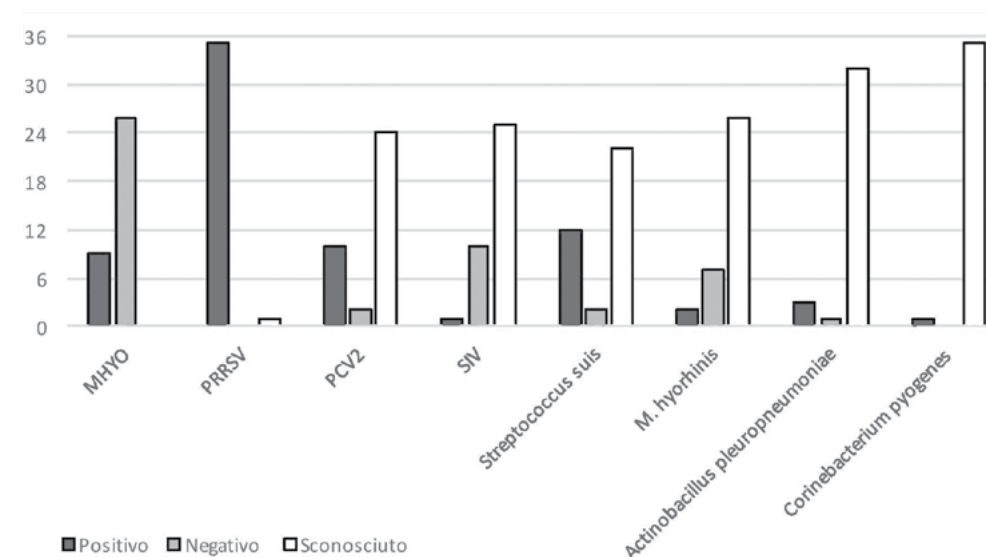


Figura 8. Conteggio degli esiti diagnostici relativi ad altri patogeni nei campioni risultati positivi alla ricerca di PCV3.

Figure 8. Count of test results for different pathogens in PCV3-positive samples.

La positività per Mhyo è stata riscontrata in presenza di sintomatologia respiratoria (5/28), di segni sistemici (1/14) e di sintomi riproduttivi (1/7); i restanti 14 rinvenimenti sono avvenuti a partire dai 71 campioni prelevati per autocontrollo.

PCV3 è stato ritrovato in presenza di sintomi respiratori (12/28) e sistemici (3/14), ma non riproduttivi (0/7), mentre le altre 21 positività sono state attestate in assenza di segni clinici.

Su 43 casi in cui era segnalata la presenza di lesioni broncopolmonari, 9 si sono rivelati interessati da Mhyo e 18 da PCV3.

DISCUSSIONE

Le prestazioni delle due metodiche messe a punto si sono rivelate soddisfacenti in termini di sensibilità, specificità e ripetibilità. A ciò si aggiunge la convenienza intrinsecamente offerta dalle caratteristiche della *direct PCR*: non essendo richiesto l'impiego di kit di estrazione, la durata delle prove diagnostiche risulta infatti sostanzialmente dimezzata (con un beneficio tanto maggiore quanto più alto è il numero dei campioni); il risparmio economico, considerando anche il minor consumo di materiale monouso come puntali e provette, è invece grossolanamente stimabile sui 3,5-4 € per singolo campione.

Sebbene durante il processo di validazione non si siano ravvisati problemi, all'effettiva applicazione del protocollo relativo a Mhyo è stata riscontrata la sporadica presenza di bande aspecifiche (Figura 9a); essendo però queste ultime facilmente distinguibili dagli amplificati desiderati, si è scelto di non modificare ulteriormente i parametri, in quanto la ricerca di una maggior specificità avrebbe potuto impattare negativamente sulla sensibilità. Il protocollo di PCV3 si è invece confermato esente da questa problematica (Figura 9b).

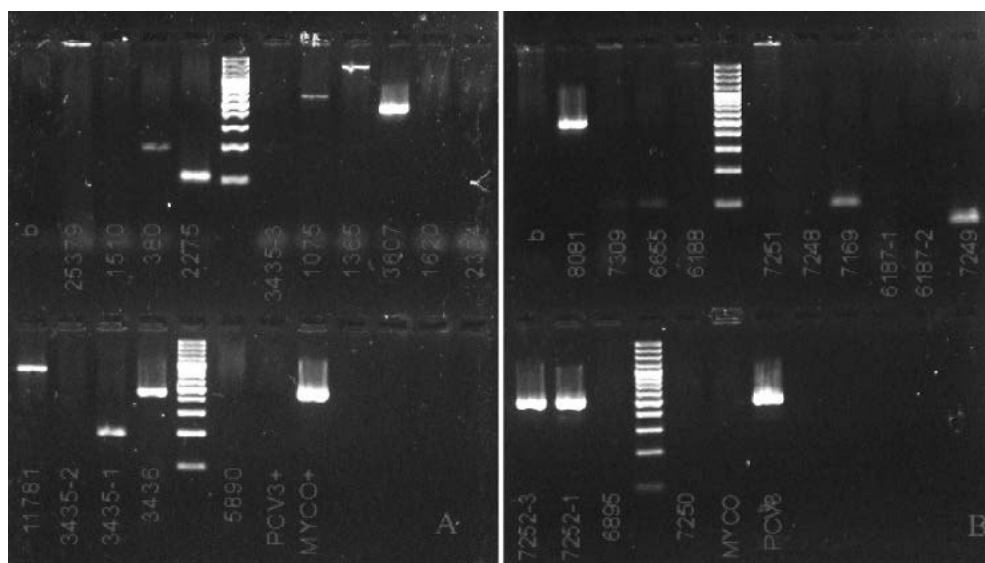


Figura 9 (a-b). Risultati della PCR diagnostica per Mhyo (a) e PCV3 (b) effettuata su alcuni campioni. Solo nel primo caso si ravvisa la presenza di alcune bande aspecifiche.
Figure 9 (a-b). PCR products obtained by amplification of Mhyo (a) and PCV3 (b). In the first case, some sporadic non-specific bands were present.

L'utilizzo delle metodiche validate per analizzare campioni provenienti dal territorio e l'analisi delle informazioni ad essi associate ha permesso di ottenere rilevanti informazioni sull'epidemiologia di questi patogeni.

La presenza di PCV3 sul territorio italiano, alla luce della marcata globalizzazione caratterizzante il settore suinicolo, non deve stupire. Le positività riscontrate non sono peraltro limitate ad un rinvenimento sporadico, ma evidenziano come PCV3 sia ampiamente diffuso nonostante la recentissima scoperta. Sebbene non sia possibile inferire sulla prevalenza per via della natura del campionamento, PCV3 è stato ritrovato nel 30% dei campioni: un dato sorprendente, il quale non fa che corroborare l'ipotesi che questo microrganismo sia epidemiologicamente affine a PCV2, patogeno ubiquitario e nella maggior parte dei casi non associato a sintomatologia clinica (Alarcon et al., 2013). Similmente, la distribuzione di Mhyo conferma come si tratti di un patogeno comunemente circolante. L'utilizzo di matrici non considerate ideali per la ricerca di questo batterio porta però a pensare che le positività attestate siano in realtà sottostimate.

La distribuzione di PCV3 nelle diverse fasce d'età e nei diversi siti produttivi non risulta trattata negli studi svolti finora su questo microrganismo. I dati raccolti nell'ambito di questo progetto mostrano un picco statisticamente significativo (con un 51% di positività) in corrispondenza del periodo tra la quinta e l'ottava settimana di vita: ciò è probabilmente collegato al rimescolamento e allo stress a cui sono sottoposti i suinetti al momento dello svezzamento, un momento particolarmente critico dal punto di vista in termini di pressione infettante e di capacità di risposta dell'animale. La progressiva decrescita dell'incidenza fino all'8% riscontrato in fase di ingrasso rende plausibile ipotizzare che gli animali acquisiscano un'immunità in grado di contrastare efficacemente l'infezione; non è inoltre da escludere che l'organizzazione tipicamente multisito della filiera da cui provenivano i campioni contribuisca a combattere la trasmissione orizzontale. Il fatto che sia nelle scrofe sia nei lattinzoli si sia rinvenuto PCV3 porta a speculare sulla possibilità di una qualche forma di trasmissione verticale, sebbene il mancato rilevamento del virus in tessuti fetali non permetta di stabilire se questa trasmissione avvenga a livello intrauterino, o se invece

interessi il periparto. Le informazioni raccolte delineano un quadro epidemiologico che ancora una volta presenta punti di contatto con PCV2.

Per quanto riguarda Mhyo, la classica forma endemica della polmonite enzootica è sostenuta dalla trasmissione verticale diretta a livello di scrofaia e successivamente da un lento *spread* mediato dai suinetti infetti che coinvolge dapprima i compagni di nidiata e poi quelli di box (Thacker and Minion, 2012). I dati ottenuti confermano un pattern di questo tipo, con una decrescita progressiva delle positività dal 31% rilevato tra i lattinzoli (1°-4° settimana), al 24% tra i suinetti (5°-8° settimana), al 17,65% tra i magroni (9°-12° settimana), fino allo 0% attestato in fase di ingrasso. Per quanto riguarda le scrofe, è stato riportato un rapporto di proporzionalità inversa tra il numero di parti e la prevalenza di Mhyo, con le scrofe che presentano tassi di infezione più alti (Calsamiglia and Pijoan, 2000). Ciò è in accordo con i dati raccolti in questo studio, per quanto numericamente esigui (anche considerando che alcuni campioni sono stati prelevati da scrofe interessate da problematiche riproduttive, non associabili alla presenza di Mhyo).

Ai fini di una efficace applicazione di metodiche basate su PCR, il tipo di materiale biologico da cui viene estratto il materiale genetico risulta determinante per due principali ragioni: da una parte taluni patogeni sono caratterizzati da un tropismo per tessuti specifici e non risultano rilevabili in altri, dall'altra la natura della matrice può interferire in varia misura sulle prestazioni analitiche dei protocolli usati. Essendo il 90% dei campioni analizzati costituiti da sangue, polmone, *pool* di vari tessuti e fluido orale, si è deciso di comparare i risultati ottenuti a partire da queste matrici senza includere le rimanenti in quanto scarsamente rappresentate.

Le differenze tra le positività per Mhyo riscontrate nelle diverse matrici non si sono rivelate statisticamente significative. Il numero di positivi attestati a partire da tessuti polmonari era però in difetto rispetto alle frequenze attese: ciò può trovare spiegazione nel fatto che il polmone non rappresenta il sito d'elezione da campionare per la ricerca di Mhyo, non garantendo la stessa sensibilità che si avrebbe usando lavaggi broncoalveolari o tamponi tracheali (Fablet et al., 2010; Kurth et al., 2002). Poco idonei alla ricerca di questo microrganismo vanno considerati anche sangue, *pool* di organi e fluidi orali: come già scritto, è quindi ipotizzabile che le positività riscontrate siano fortemente sottostimate. Anche per ciò che concerne il riscontro di PCV3 non si sono evidenziate differenze statisticamente significative fra diverse matrici, per quanto sia possibile osservare un eccesso di positivi rispetto alle frequenze attese relativamente al tessuto polmonare. Mentre il rilevamento di PCV3 tramite PCR a partire da siero, polmone ed altri organi è già stato riportato (Ku et al., 2017; Palinski et al., 2017) la possibilità di amplificarne il DNA a partire dai fluidi oronasali rappresenta un dato inedito.

Per quanto riguarda gli altri tipi di materiale biologico, un tampone nasale si è rivelato positivo per PCV3: anche in questo caso si tratta di una matrice mai testata prima per questo microrganismo. Tutte le spugnette, i tessuti placentari e i raschiati orofaringei sono invece risultati negativi per entrambi i microrganismi. È inoltre interessante notare come le PCR condotte a partire da campioni di materiale fetale o sangue materno collegati ad episodi di aborto non abbiano evidenziato in nessuno dei 7 casi la presenza di PCV3, a differenza di quanto riportato da altri autori (Palinski et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). Al contrario, uno dei feti è risultato positivo per Mhyo, per il quale non è riferita la possibilità di trasmissione intrauterina (Bürgi et al., 1990): considerato l'ingente *shedding* di Mhyo attraverso i secreti oronasali delle madri, ciò è probabilmente da attribuirsi ad una contaminazione ambientale ad aborto avvenuto.

La natura del campionamento si è rivelata un ostacolo nell'elaborazione dei dati relativi alle coinfezioni. Tutti i campioni erano infatti positivi almeno a uno tra PRRSV e PCV2, e l'intensità con cui i vari patogeni erano stati ricercati risultava estremamente variabile. Nella maggior parte dei casi ci si è quindi dovuti limitare a statistiche puramente descrittive. Attualmente non è disponibile alcun dato inerente alle interazioni tra PCV3 ed altri patogeni, quindi tutte le informazioni relative alle coinfezioni sono da considerarsi

inedite. La frequenza di rinvenimento di PCV3 nei campioni positivi per PRRSV si è rivelata maggiore rispetto alle attese, tanto da essere statisticamente significativa (Figura 10a). Questo dato è ulteriormente corroborato dal fatto che la frequenza delle positività per Mhyo (patogeno noto per le sue interazioni con PRRSV) non risulta influenzata dalla presenza o meno di PRRSV (Figura 10b), facendo pensare che il *bias* dovuto al campionamento sia in questo caso trascurabile. In ogni caso, l'accertamento del significato eziopatogenetico di questa associazione necessita di ulteriori studi sperimentali.

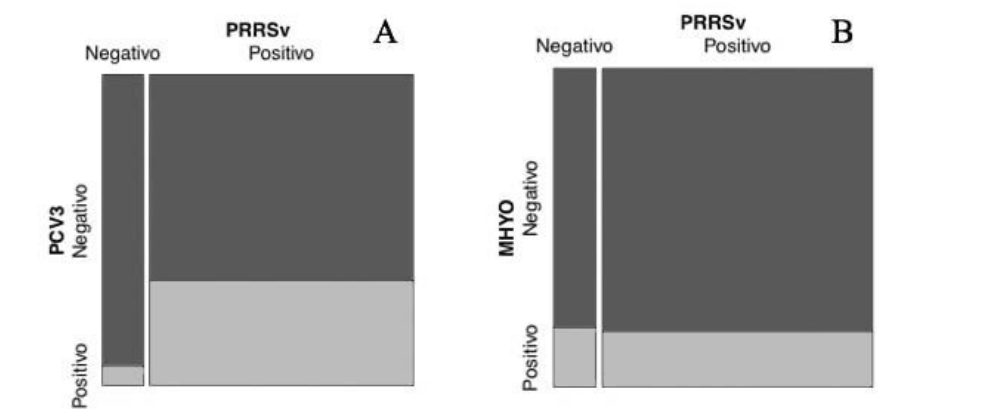


Figura 10 (a-b). *Mosaic plot* che mettono in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 e PRRSV (a) e di Mhyo e PRRSV (b).

Figure 10 (a-b). *Mosaic plots that show how PRRSV test results relate to PCV3 (a) and Mhyo (b) ones.*

Il ritrovamento di PCV3 è stato più frequente rispetto alle attese in campioni negativi per PCV2, ma ancora una volta si tratta di una differenza non statisticamente significativa (Figura 11). Per quanto suggestiva, l'eventualità che esista una competizione di qualche tipo tra PCV3 e PCV2 è ancora tutta da provare.

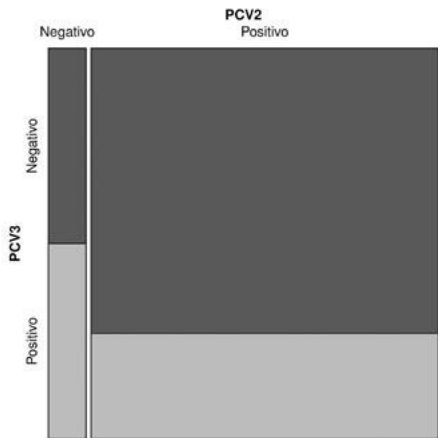


Figura 11. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con quelli relativi a PCV2.

Figure 11. *Mosaic plot that shows the relationship between PCV3 and PCV2 test results.*

Tutti i microrganismi (con l'ovvia eccezione di PCV3) ritrovati in coinfezione con Mhyo risultavano ampiamente descritti come patogeni secondari la cui infezione è favorita dall'azione immunodepressiva di Mhyo (Thacker and Minion, 2012). La frequenza con cui PCV3 è stato rinvenuto risulta maggiore rispetto alle attese in campioni prelevati in presenza di sintomatologia (Figura 12) e di reperti necroscopici patologici (Figura 13). Queste differenze non si sono tuttavia rivelate significative dal punto di vista statistico e, alla luce della natura del campionamento, non è possibile affermare che siano dovute a fondate ragioni eziopatogenetiche; più facile è supporre che le differenze osservate siano dovute almeno in parte all'effetto confondente della matrice campionata, dato che spesso alla presenza di sintomi e lesioni di natura respiratoria corrispondevano campioni prelevati a livello polmonare, in cui PCV3 è stato ritrovato più frequentemente rispetto ad altri tipi di matrice.

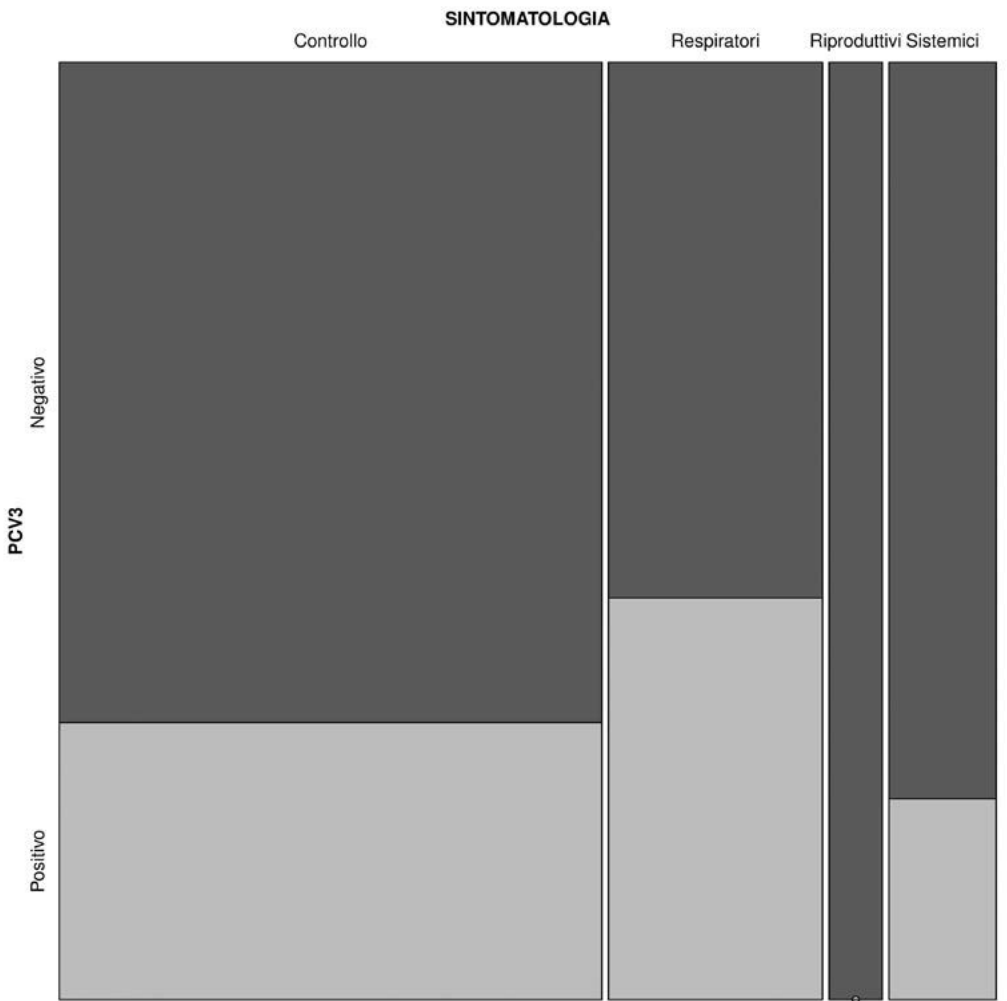


Figura 12. *Mosaic plot* che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con l'anamnesi legata al prelievo.

Figure 12. *Mosaic plot that shows the relationship between PCV3 test results and the presence of clinical signs.*

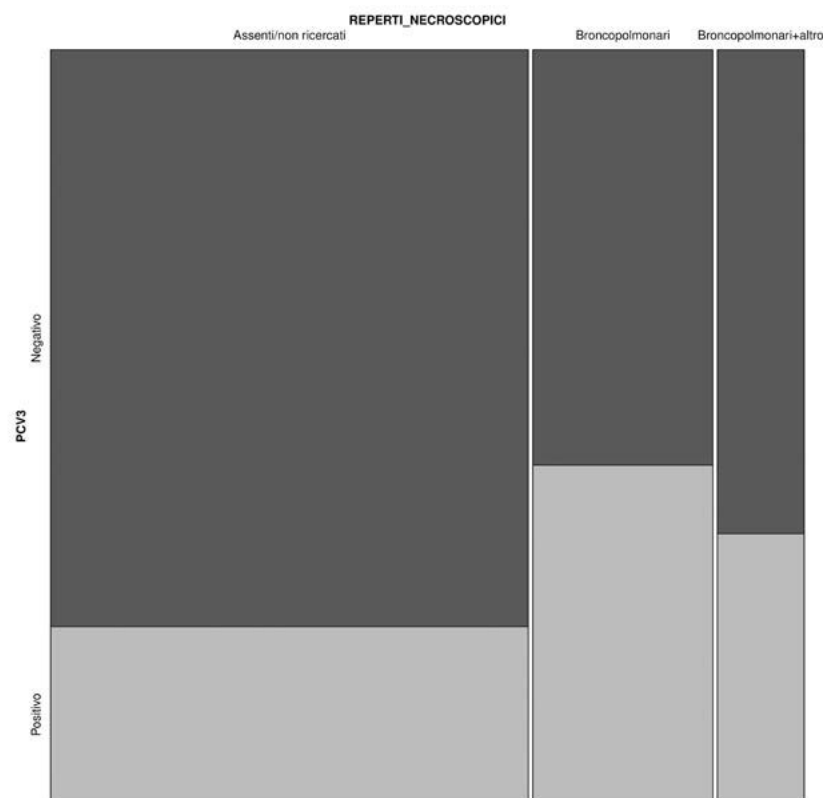


Figura 13. Mosaic plot che mette in relazione gli esiti della ricerca di PCV3 con la presenza di reperti necroscopici.
Figure 13. Mosaic plot that shows the relationship between PCV3 test results and the presence of anatomopathological findings.

Anche la frequenza con cui è stato rinvenuto Mhyo non presenta differenze statisticamente significative a prescindere dalla presenza o meno di sintomi o di reperti necroscopici, nonostante questo batterio reciti un ruolo chiave in numerosi meccanismi patogenetici a livello respiratorio. Ciò può forse spiegarsi considerando che l'85% dei campioni positivi per Mhyo (e l'87% dei campioni totali) risultavano positivi anche per PRRSV: in questo caso il ruolo di Mhyo non sarebbe quello classico di "door-opener", quanto piuttosto quello di fattore complicante l'infezione virale (Thacker et al., 1999). Sintomi e lesioni potrebbero quindi essere presenti a prescindere da Mhyo, il quale avrebbe il solo effetto di aggravarli. Pur in assenza di dati sui protocolli vaccinali adottati nei diversi allevamenti, non è da escludersi che anche la profilassi indiretta reciti un ruolo importante nel complicare l'interpretazione dei risultati: essa è infatti in grado di ridurre significativamente l'entità di sintomi e lesioni respiratori, ma non di evitare la colonizzazione (e quindi la positività alla PCR) né di diminuire la trasmissione (Haesebrouck et al., 2004). Parallelamente allo svolgimento dei saggi di PCR, si è deciso di sequenziare il genoma completo di PCV3 a partire da uno dei campioni risultati positivi, precisamente il 32941. Ciò è stato fatto con una doppia finalità: da una parte confermare la specificità del metodo, dall'altra avere a disposizione la sequenza di un isolato di PCV3 effettivamente circolante sul suolo italiano.

La sequenza ottenuta, seppur chiaramente interna allo stesso *clade* raggruppante gli altri genomi conosciuti di PCV3 (Figura 14), risulta diversa da quelle cinesi e statunitensi attualmente note. Particolarmente importante è la distanza genetica dalla sequenza 29160, dalla quale è stato ricavato il controllo positivo utilizzato in questo lavoro, attestante l'assenza di false positività dovute a cross-contaminazioni. L'evidente diversità genomica tra i diversi isolati, unitamente ad una circolazione attestata in diversi contesti geografici, rende altamente plausibile l'ipotesi che le radici della storia evolutiva di PCV3 siano di gran lunga antecedenti alla sua scoperta, contribuendo ad accumulare una volta di più questo virus emergente con PCV2.

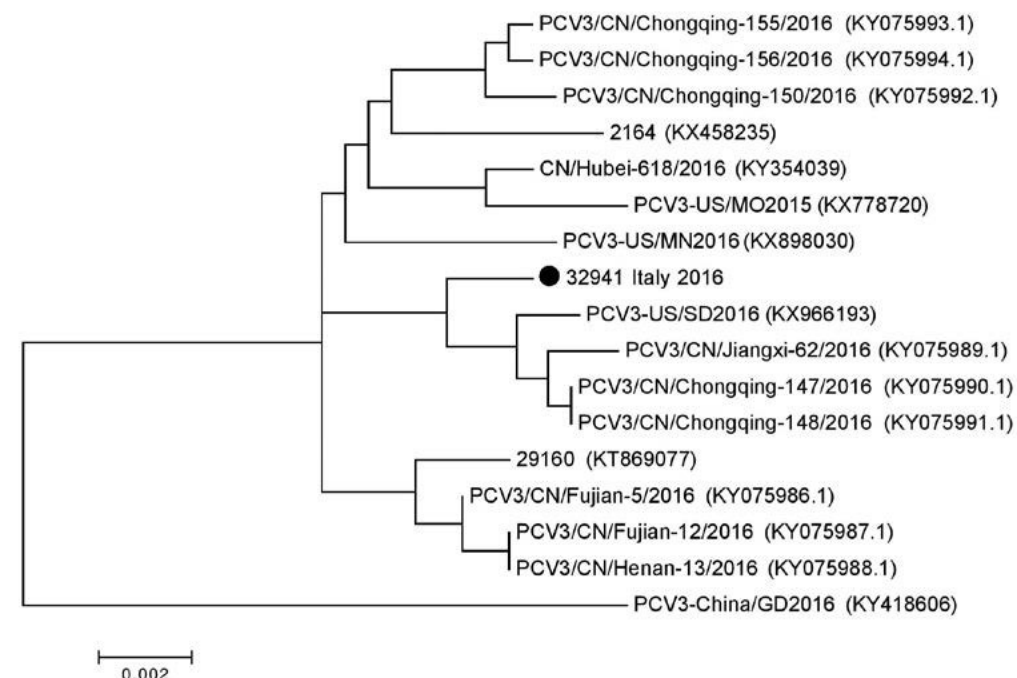


Figura 14. Albero filogenetico raggruppante tutte le sequenze di PCV3 conosciute. La sequenza evidenziata (cerchio nero) è stata ottenuta a partire dal campione 32941. L'albero è stato costruito con il software MEGA7 (Kumar et al., 2016) applicando il metodo di *Maximum Likelihood*, basato sul modello Tamura-Nei, a sequenze precedentemente allineate con il metodo *MUSCLE*.
Figure 14. Phylogenetic tree including all available PCV3 sequences. The highlighted sequence (full circle) has been obtained by sequencing sample 32941. The tree was built with MEGA7 software (Kumar et al., 2016), by applying the Maximum Likelihood approach based on Tamura-Nei model on sequences that were aligned with MUSCLE.

CONCLUSIONI

Il primo e principale obiettivo di questo studio era di natura marcatamente pratica: mettere a disposizione una metodica che potesse rappresentare un'alternativa concreta a quelle attualmente impiegate per la ricerca di Mhyo e di PCV3. In quest'ottica, l'adozione di

protocolli basati su *direct PCR* offre indiscutibili vantaggi: oltre ad essere facilmente attuabili nella pratica laboratoristica quotidiana, essi si sono rivelati estremamente convenienti sia dal punto di vista dei costi che dei tempi necessari alle analisi. La validazione dei protocolli ha infine permesso di attestarne le buone prestazioni in termini di specificità, sensibilità, ripetibilità e robustezza nei confronti dell'eterogeneità genetica dei microrganismi bersaglio: le loro performance si sono rivelate assolutamente comparabili con quelle garantite da saggi di PCR tradizionali.

Emerge quindi chiaramente la competitività delle metodiche prese in esame. Ciò vale per quanto riguarda Mhyo, la cui natura di batterio dalla crescita tipicamente *fastidious* rende la PCR un ausilio diagnostico di larghissimo impiego (Sibila et al., 2009) e ancor di più per quanto concerne PCV3: collocandosi in un contesto di ricerca ancora largamente inesplorato e in cui le alternative già validate sono poche, il protocollo ivi descritto potrebbe risultare estremamente utile per lo *screening* di grandi quantitativi di campioni. Una volta accertata l'accuratezza dei metodi diagnostici, essi sono stati applicati per la ricerca dei due microrganismi su campioni sperimentali provenienti da una delle maggiori realtà produttive del Norditalia. Mettendo in relazione gli esiti della ricerca di Mhyo e PCV3 con le informazioni disponibili in merito ai succitati campioni, è stato possibile estrapolare numerosi dati sull'epidemiologia dei due microrganismi.

Nel caso specifico di Mhyo, i trend osservati concordavano in massima parte con la vasta letteratura disponibile in merito. Il quadro ottenuto descrive un patogeno largamente diffuso, che tende ad infettare più frequentemente gli animali giovani ed è presente in coinfezione con numerosi patogeni secondari. L'uso di matrici poco idonee alla ricerca di questo batterio ha reso però poco rappresentative le frequenze rilevate, così come l'assenza di una chiara associazione attestata tra la presenza di Mhyo e la manifestazione di sintomi e lesioni respiratori è probabilmente da attribuirsi ad un *bias* di campionamento.

Diversa è la situazione in merito a PCV3: trattandosi di un virus scoperto solo recentemente, molti aspetti della sua epidemiologia risultano ancora oscuri. Questo studio ha permesso di muovere i primi passi in tal senso, a partire dal rinvenimento di PCV3 sul territorio italiano, che va ad aggiungersi al numero in rapida crescita di segnalazioni provenienti da diverse parti del mondo (Kwon et al., 2017; Palinski et al., 2017; Phan et al., 2016; Stadejek et al., 2017) respiratory and enteric disease, reproductive failure, and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS). Le numerose positività riscontrate dimostrano peraltro la comune circolazione di PCV3, la quale rappresenta solo uno dei molti punti di contatto tra la sua epidemiologia e quella dell'ubiquitario PCV2.

Tra le altre informazioni ricavate si annoverano la presenza di un picco di frequenze di PCV3 in soggetti dall'età compresa tra le 5 e le 8 settimane, il rinvenimento a partire da matrici mai testate sinora e la presenza in coinfezione con vari patogeni sia virali che batterici; è stata inoltre attestata un'associazione statisticamente significativa tra le positività per PCV3 e quelle per PRRSV. Per una piena comprensione del significato di questi risultati, e quindi della reale importanza eziopatogenetica di PCV3, saranno ovviamente necessari ulteriori studi sperimentali, scevri dalle limitazioni che hanno connotato questo progetto, legate essenzialmente alla natura del campionamento, non sistematico ma di convenienza, la quale non ha permesso l'elaborazione di dati di prevalenza.

In un simile contesto, degno di nota è anche l'avvenuto sequenziamento, a partire da uno dei campioni rivelatisi positivi, di un genoma completo di PCV3, il quale risulta diverso da tutte le altre sequenze attualmente disponibili. Ciò fa propendere fortemente per l'ipotesi che la storia evolutiva di PCV3 abbia radici molto più antiche rispetto alla sua scoperta: si tratta dell'ennesima somiglianza con PCV2, la cui circolazione è stata dimostrata antecedere di decenni l'improvvisa affermazione di questo virus come patogeno su scala globale (Segalés et al., 2013).

I dati raccolti rappresentano quindi un promettente punto d'inizio per lo studio di questo microrganismo emergente, oltre ad essere un chiaro esempio dei risultati ottenibili applicando le metodiche validate in questo studio.

BIBLIOGRAFIA

- Alarcon, P., Rushton, J., Wieland, B. (2013) "Cost of post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type-2 subclinical infection in England – An economic disease model". *Prev. Vet. Med.* 110, 88–102.
- Bürge, E., Seiz, O., Bertschinger, H.U. (1990) "Lack of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* from dam to fetus in experimentally infected pregnant gilts". 11th Int. Pig Vet. Soc. Congr., Lausanne, Switzerland, July 1-5, 1990.
- Calsamiglia, M., Pijoan, C. (2000) "Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows". *Vet. Rec.* 146, 530–2.
- Chae, C., 2016. "Porcine respiratory disease complex : Interaction of vaccination and porcine circovirus type 2 , porcine reproductive and respiratory syndrome virus , and *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet. J.* 212, 1–6.
- Drew, T.W. (2011) "The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity?". *Rev. Sci. Tech.* 30, 95–106.
- Fablet, C., Marois, C., Kobisch, M., Madec, F., Rose, N. (2010) "Estimation of the sensitivity of four sampling methods for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in live pigs using a Bayesian approach". *Vet. Microbiol.* 143, 238–245.
- Fan, S., Ku, X., Chen, F., Wang, Y., Yu, X., He, Q. (2017) "Complete Genome Sequence of a Novel Porcine Circovirus Type 3 Strain, PCV3/CN/Hubei-618/2016, Isolated from China". *Genome Announc.* 5, e00100-17.
- Fournié, G., Kearsley-Fleet, L., Otte, J., Pfeiffer, D.U. (2015) "Spatiotemporal trends in the discovery of new swine infectious agents". *Vet. Res.* 46, 114.
- Haesebrouck, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., Decostere, A. (2004) "Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect?" *Vet. Microbiol.* 100, 255–268.
- Ku, X., Chen, F., Li, P., Wang, Y., Yu, X., Fan, S., Qian, P., Wu, M., He, Q. (2017) "Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China". *Transbound. Emerg. Dis.* 64(3), 703-708.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. "MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets". *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kurth, K., Hsu, T., Snook, E. (2002) "Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine". *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 463–469.
- Kwon, T., Yoo, S.J., Park, C.-K., Lyoo, Y.S. (2017) "Prevalence of novel porcine circovirus 3 in Korean pig populations". *Vet. Microbiol.* 207, 178–180.
- Maes, D., Deluyker, H., Verdonck, M., Castryck, F., Miry, C., Lein, A., Vrijens, B., de Kruif, A. (1998) "The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system". *Zentralbl. Veterinarmed. B* 45, 495–505.
- Maes, D., Verdonck, M., Deluyker, H., de Kruif, A. (1996) "Enzootic pneumonia in pigs". *Vet. Q.* 18, 104-9.
- Meng, X.-J., 2012. "Spread like a wildfire-The omnipresence of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its ever-expanding association with diseases in pigs". *Virus Res.* 164, 1–3.
- Palinski, R., Piñeyro, P., Shang, P., Yuan, F., Guo, R., Fang, Y., Byers, E., Hause, B.M. (2017) "A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure". *J. Virol.* 91, e01879-16.
- Phan, T.G., Giannitti, F., Rossow, S., Marthaler, D., Knutson, T., Li, L., Deng, X., Resende, T., Vannucci, F., Delwart, E. (2016) "Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation". *Virol. J.* 13, 184.
- Puvanendiran, S., Stone, S., Yu, W., Johnson, C.R., Abrahante, J., Jimenez, L.G., Griggs, T., Haley, C., Wagner, B., Murtaugh, M.P. (2011) "Absence of porcine circovirus type 1 (PCV1) and high prevalence of PCV 2 exposure and infection in swine finisher herds". *Virus Res.* 157, 92–98.

- Rosario, K., Breitbart, M., Harrach, B., Segalés, J., Delwart, E., Biagini, P., Varsani, A. (2017) “Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus”. *Arch. Virol.* 1–17.
- Segalés, J., Kekarainen, T., Cortey, M. (2013) “The natural history of porcine circovirus type 2: From an inoffensive virus to a devastating swine disease?” *Vet. Microbiol.* 165, 13–20.
- Shen, H., Liu, X., Zhang, P., Wang, L., Liu, Y., Zhang, L., Liang, P., Song, C. (2017) “Genome characterization of a porcine circovirus type 3 in South China”. *Transbound. Emerg. Dis.* 65(1), 264–266.
- Sibila, M., Pieters, M., Molitor, T., Maes, D., Haesebrouck, F., Segalés, J. (2009) “Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection”. *Vet. J.* 181, 221–231.
- Simionatto, S., Marchioro, S.B., Maes, D., Dellagostin, O.A. (2013) “*Mycoplasma hyopneumoniae*: From disease to vaccine development”. *Vet. Microbiol.* 165, 234–242.
- Stadejek, T., Woźniak, A., Milek, D., Biernacka, K. (2017) “First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland”. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 1350–1353.
- Team, R.C. (2016) “R Language Definition”.
- Thacker, E.L., Halbur, P.G., Ross, R.F., Thanawongnuwech, R., Thacker, B.J. (1999) “*Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia”. *J. Clin. Microbiol.* 37, 620–7.
- Thacker, E.L., Minion, F.C. (2012) “Mycoplasmosis”, in: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., *Diseases of Swine*, 10th Edition. Wiley-Blackwell, Ames, pp. 779–797.
- Tombácz, K., Patterson, R., Grierson, S.S., Werling, D. (2014) “Lack of genetic diversity in newly sequenced porcine circovirus type 1 strains isolated 20 years apart”. *Genome Announc.* 2(2), e00156-14.

**PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2018
CANDIDATI**

**NUOVO APPROCCIO DIAGNOSTICO PER LA RICERCA DI
ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN MAIALI MACELLATI
REGOLARMENTE**

***NEW DIAGNOSTIC APPROACH TO THE INVESTIGATION
OF ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN REGULARY
SLAUGHTERED PIGS***

COIN P.¹, CEGLIE L.², CONFICONI D.¹, MIOTTI SCAPIN R.¹, RAMPAZZO E.²,
NARDELLI S.², GIACCONE V.¹

¹ Università degli studi di Padova; ² Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: mal rossino, PCR, sierologia

Key words: swine erysipelas, PCR, antibodies analysis

Riassunto: Il “mal rossino” è una zoonosi causata da *E. rhusiopathiae*, di cui il suino è il principale serbatoio in natura. Questa indagine preliminare ha l’obiettivo di valutare la presenza di *E. rhusiopathiae* in suini macellati regolarmente e di sviluppare un approccio diagnostico integrato volto all’identificazione del microrganismo. In totale sono stati campionati 89 suini appartenenti a 6 allevamenti diversi. Le matrici campionate sono state: cute (attraverso l’utilizzo di *spongebag*) e feci appartenenti allo stesso animale. Per la ricerca diretta del microrganismo dopo pre-arricchimento è stato utilizzato un saggio di SYBRGreen Real-time PCR e in caso di positività si è proceduto all’isolamento del patogeno tramite terreni selettivi. Un campione su 178 è risultato positivo alla rPCR, tuttavia all’isolamento non è stata osservata alcuna crescita del patogeno in esame. Il siero di 90 suini campionati nelle stesse partite è stato esaminato utilizzando due kit commerciali ELISA per la ricerca di anticorpi (A e B). Con la metodica A sono risultati positivi 8/90, mentre con la B 4/90 sono risultati positivi e 2/90 “dubbi”. I suini risultati positivi alla ricerca indiretta del microrganismo rientrano nello stesso allevamento del suino risultato positivo alla ricerca diretta. I risultati non permettono di definire la prevalenza di *E. rhusiopathiae* negli allevamenti suinicoli del territorio, ma possono essere utili come dati preliminari per definire un protocollo di ricerca approfondita.

Abstract: “Erysipelas” is a zoonotic disease caused by *E. rhusiopathiae* and swine is considered the most relevant reservoir of the agent. The aim of the study was to investigate its presence in slaughtered pigs without clinical signs and to evaluate a combined diagnostic approach for the identification of the microorganism. The sampled matrices were: skin (sampled using *spongebag*) and stools from the same animal. In total 89 swine belonging to 6 different farms were sampled in this study. For the detection of *E. rhusiopathiae*, two diagnostic methods were applied to these samples: SYBR Green Real-time PCR and subsequently, on the PCR positive samples culture method for isolation using selective media. The agent was identified in 1 out of 178 samples using the molecular method, but isolation on the selective media did not succeed. At the same time, two indirect ELISA kits were used to search for antibodies in sera of 90 pigs sampled from the same batches used for the microorganism detection. In test A 8/90 were positive and in the test B 4/90 were positive and 2/90 were uncertain. Positive ELISA samples belonged to the same farm of the PCR positive swine. Results obtained do not allow determining a prevalence of *E. rhusiopathiae*, but they could represent preliminary data to establish a diagnostic approach for further and more extended investigations.

INTRODUZIONE

Il mal rossino è una zoonosi causata da un batterio classificato oggi come *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Il panorama epidemiologico complessivo dell'infezione in Italia è ancora poco chiaro, in quanto non vi sono dati aggiornati sulla reale prevalenza di tale malattia all'interno degli allevamenti suini nazionali. Il progetto aveva due obiettivi: effettuare un'indagine preliminare sulla presenza di *E. rhusiopathiae* in suini macellati regolarmente provenienti da diversi allevamenti intensivi del territorio e ipotizzare un metodo diagnostico rapido ed efficace che possa essere utile ai fini della ricerca del microrganismo in suini asintomatici.

Erysipelothrix rhusiopathiae è un microrganismo conosciuto da più di un secolo. Robert Koch lo isolò per primo nel sangue di un topo nel 1876 (Brooke e Riley, 1999). Il genere *Erysipelothrix* comprende quattro specie: *E. rhusiopathiae*, *E. tonsillarum*, *E. inopinata* e *E. larvae*. Il primo ha la maggiore importanza clinica (Clark, 2015). Nel suino ci sono stati rari casi di artrite ed endocardite croniche da *E. tonsillarum*, ma si presume che non sia un patogeno così importante come *E. rhusiopathiae* (Opriessnig e Wood, 2012).

Erysipelothrix rhusiopathiae e l'infezione causata da questo microrganismo nell'uomo e negli animali hanno una distribuzione mondiale. Diversi casi nel suino sono stati documentati in Africa, Nord America, Europa, Cina, Giappone e Australia (Reboli e Farrar, 1989).

Il batterio è stato trovato come patogeno o commensale in molte specie di vertebrati tra le quali almeno 30 specie differenti di uccelli e 50 di mammiferi ed invertebrati (Opriessnig e Wood, 2012). Il serbatoio maggiore è il suino domestico pertanto l'impatto economico maggiore riguarda l'allevamento suinicolo, tuttavia l'erisipela ovvero la malattia causata da *E. rhusiopathiae* ha un impatto economico anche negli allevamenti di pecore, tacchini, anatre, polli ed emù (Brooke e Riley, 1999). Si stima che circa il 30- 50% dei suini sia portatore del batterio a livello di tonsille e altri tessuti linfoidi (Colavita *et al.*, 2006). Il microrganismo è stato isolato anche in milza, intestino e midollo osseo (Clark, 2015). Molti animali possono fungere da vettori del microrganismo, tra questi abbiamo vertebrati come roditori, uccelli, pesci ed invertebrati come mosche ed acari (Clark, 2015).

E. rhusiopathiae viene trasmesso direttamente con feci, urina, saliva e secrezioni nasali o indirettamente tramite contaminazione ambientale (Reboli e Farrar, 1989). I suini possono infettarsi dall'assunzione di cibo o acqua contaminati oppure dalla contaminazione di ferite cutanee (Wang *et al.*, 2010).

E. rhusiopathiae può resistere al massimo fino a 35 giorni nell'ambiente (Opriessnig e Wood, 2012), viene inattivato a 55°C per 15 minuti, ma riesce a resistere a temperature di refrigerazione per 10 giorni; resiste a processi di conservazione come salatura, salagione, sotto aceto (carne o bacon marinati contengono *Erysipelothrix* fino a 170 giorni oppure fino a 30 giorni se trattate con sale e nitrato di potassio) e affumicatura (Wang *et al.*, 2010).

L'erisipela suina può colpire soggetti di tutte le età, ma sono maggiormente suscettibili le scrofe gravide e suini da 2-12 mesi d'età (Craig *et al.*, 2016). La malattia si può presentare in tre forme cliniche: acuta, subacuta, cronica. L'erisipela acuta è caratterizzata, 2-3 giorni dopo l'esposizione al patogeno, da lesioni cutanee rilevate di dimensioni variabili da 1-2 cm a 4-5 cm, di colore da rosa a violaceo-rosso, con forma a losanga che scompaiono dopo 4-7 giorni (Colavita *et al.*, 2006). Il trattamento di scelta per l'erisipela acuta suina è la penicillina (Opriessnig e Wood, 2012). La vaccinazione viene considerata una procedura utile per controllare il problema negli animali (Wang *et al.*, 2010).

E. rhusiopathiae è un agente di zoonosi e sono maggiormente esposti al rischio di contagio i soggetti coinvolti in occupazioni o attività che comportano il contatto diretto con animali, prodotti animali o rifiuti di origine animale. L'infezione da *E. rhusiopathiae* è considerata una malattia professionale (Wang *et al.*, 2010) e deriva da una ferita provocata da materiale infetto o contaminato.

MATERIALI E METODI

Lo studio prevedeva due fasi analitiche:

(1) Sviluppo di un metodo diagnostico utile alla ricerca di *E. rhusiopathiae* in matrici quali cute e feci

(2) Applicazione dello stesso a campioni di suini regolarmente macellati e abbinamento di analisi sierologiche in campioni delle stesse partite.

Nella prima fase sono state effettuate diverse prove, utilizzando un ceppo di riferimento (ATCC®19414), per mettere a punto il protocollo sperimentale per l'identificazione di *E. rhusiopathiae*. Tali prove erano volte all'identificazione dei fattori che potessero massimizzare la riuscita della ricerca, considerando le matrici investigate, ossia cute e feci. In sintesi, sono state eseguite le seguenti prove:

- Prova con diversi metodi di estrazione degli acidi nucleici e prova di sensibilità analitica del metodo di rilevazione in SYBRGreen
- Prova per determinare l'influenza della bollitura precedente all'estrazione
- Prova di modifica della temperatura di *annealing* (da 60°C a 58°C)
- Prova di specificità analitica.

Il patogeno è stato cercato in forma diretta sia utilizzando la metodica microbiologica tradizionale, modificando il protocollo sperimentale messo a punto da Colavita e coll. nel 2006, sia un saggio di PCR con rivelazione in SYBRGreen che si avvale di primer specifici per *E. rhusiopathiae*, disegnati sulle sequenze di DNA codificante per la subunità 23S del gene (Takeshi *et al.*, 2009).

Sia nella fase preliminare sia in quella di campionamento l'estrazione degli acidi nucleici è stata eseguita con il kit di estrazione QIAmp DNA mini kit (Qiagen®). Per il saggio di PCR è stato utilizzato il kit QuantiFast™ SYBRGreen: in un pozzetto la miscela di reazione conteneva i primer specifici per il frammento del gene 23S ribosomiale di *E. rhusiopathiae*, in un secondo pozzetto la miscela di reazione conteneva i primer che amplificano un frammento del gene 18S, che costituisce il controllo interno di processo, a garanzia dell'avvenuta estrazione e corretta amplificazione del campione.

Il profilo termico di reazione di amplificazione è costituito da: attivazione (95°C per 5 minuti); 40 cicli composti da denaturazione (95°C per 15 secondi), *annealing* ed estensione (60°C per 60 secondi). All'amplificazione segue una successiva dissociazione (melting) (95°C/15 secondi, 60°C/60 secondi, 95°C/15 secondi) per determinare la specificità del prodotto amplificato.

Nelle prove preliminari di PCR, l'amplificato è stato purificato e sequenziato mediante il kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing, utilizzando il sequenziatore ABI Prism 3130 DNA Sequencing System con gli stessi primer dell'amplificazione. Le sequenze nucleotidiche, allestite da tre diversi amplificati, sono state allineate mediante il software ClustalX2 con sequenze di stipiti di riferimento presenti in GenBank e rappresentative di ciascun ceppo batterico d'interesse.

In un macello del Veneto sono stati eseguiti prelievi da suini appartenenti alla categoria "grassi", sia di sesso maschile che femminile; nessuno di essi presentava segni o lesioni attribuibili al mal rossino, né era stato sottoposto a vaccinazione nei confronti di *E. rhusiopathiae*. La scelta degli animali da campionare non ha seguito un criterio di selezione, ma è stata casuale per aumentare la probabilità di rilevamento del microrganismo in esame. Le analisi sono state effettuate su due diversi matrici dello stesso animale: cotenna (con *spongebag*) e feci. In totale sono stati indagati 6 differenti allevamenti, esaminando 89 suini e 178 campioni suddivisi in 89 *spongebag* e 89 campioni fecali.

I campioni di feci e le *spongebag* sono stati sottoposti a prearricchimento in TSB (*Triptic*

Soy Broth per 24 ore a 37°C. Dopo incubazione, le aliquote dei prearricchiti sono state sottoposte a estrazione degli acidi nucleici e analizzati in PCR. In caso di positività alla PCR nei campioni prearricchiti, si procedeva alla fase di arricchimento selettivo di questi ultimi. Ciascun positivo è stato inoculato in TSB modificato con aggiunta di glucosio, gentamicina, kanamicina, Tween 80 e seminato per spatolamento in agar sangue. Dopo l'incubazione (24 ore a 37°C) dal TSB, si seminava in agar sangue e in TSA modificato (*Tryptic soy agar* con Tween 80, gentamicina, kanamicina e glucosio). Le piastre sono state nuovamente incubate (24 ore a 37°C) e il giorno successivo sono state effettuate le letture. Nel caso di colonie con morfologia attribuibile a *E. rhusiopathiae*, si procedeva all'isolamento e alla conferma mediante PCR.

Parallelamente è stato condotto uno *screening* sierologico volto alla ricerca di anticorpi nei confronti del patogeno di interesse nel gruppo campionato. Tale ricerca, sebbene non sia stata svolta sui medesimi suini soggetti al campionamento di cute e feci, aveva comunque l'obiettivo di completare i dati ottenuti, perché i sieri esaminati appartenevano a suini delle stesse partite sottoposti ad analisi diretta. La ricerca sierologica è stata condotta su 90 suini provenienti da 6 allevamenti differenti

Per la ricerca indiretta, sono stati utilizzati due kit commerciali ELISA: CIVITEST SUIS SE/MR® prodotto da HIPRA, S.A. e INGEZIM MAL ROJO® prodotto da INMUNOLOGIA Y GENETICA APLICADA, S.A.

RISULTATI

Tra le 89 *spongebag* esaminate solo una è risultata positiva in PCR, mentre nessuna positività è stata riscontrata nei campioni di feci. Tali dati sono riassunti nella Tabella 1.

Tabella 1. Risultati del campionamento mediante *spongebag* e feci e numero di campioni positivi. (N. Numero, Pos. Positività).

Table 1. Results of sampling with *spongebag* and stool and number of positive samples. (N. Number, Pos. Positive).

Allevamento	N. suini	N. <i>spongebag</i>	Pos. PCR	N. feci	Pos. PCR	Totale campioni
A	23	23	0	23	0	46
B	7	7	0	7	0	14
C	22	22	1	22	0	44
D	15	15	0	15	0	30
E	15	15	0	15	0	30
F	7	7	0	7	0	14
Totale	89	89	1	89	0	178

Il campione 992 è stato dichiarato positivo alla rPCR in quanto presentava una Tm di 81,8°C ed un picco molto simile al controllo positivo (vedi Fig. 1). Il sequenziamento dell'amplificato ha sostenuto l'ipotesi (dati non riportati).

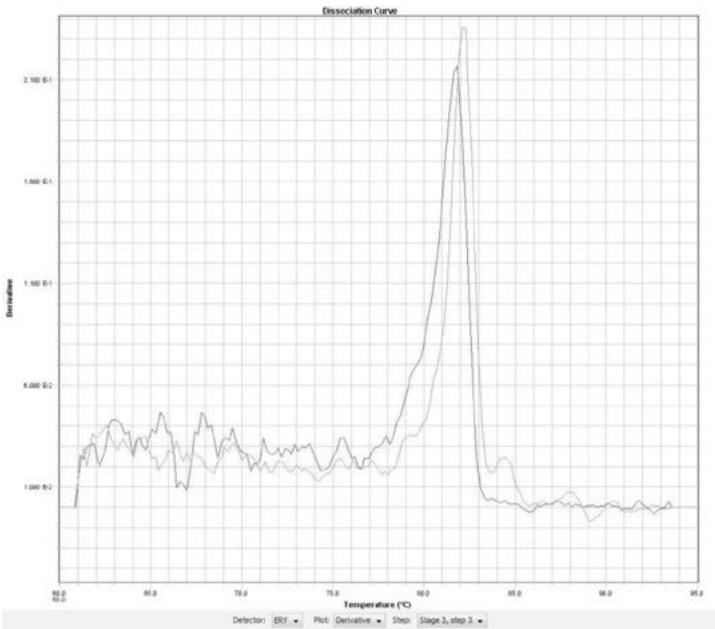


Figura 1. Confronto tra le curve di dissociazione del campione 992 e del controllo positivo. Il picco più basso corrisponde al campione 992, mentre l'altro al controllo positivo. Si può notare come siano quasi sovrapponibili.

Figure 1. Comparison between curve of dissociation of 992 sample and positive control. The lowest spike belongs to sample number 992, the other one represents the positive control. The two spikes are very close.

Dei 90 campioni di sangue testati con il kit CIVITEST®SUIS SE/MR 8 risultano positivi, mentre utilizzando il kit INGEZIM MAL ROJO® 4/90 risultano positivi e 2/90 risultano “dubbi”, in quanto presentavano un valore di densità ottica (lettura a 405 nm) compreso tra il *cut-off* negativo e quello positivo, come riportato in. Tabella 2.

Tabella 2. Risultati della ricerca sierologica mediante i due kit commerciali ELISA. (N. Numero, Pos. Positività).

Table 2. Results of antibody screening with two ELISA kits. (N. Number, Pos. Positive).

Allevamento	N. suini	N. campioni sangue	Pos. CIVITEST®	Pos. INGEZIM®
A	23	23	0	0
B	7	7	0	0
C	23	23	8	4(2)*
D	15	15	0	0
E	15	15	0	0
F	7	7	0	0
Totale	90	90	8	4(2)*

* “campioni dubbi”, “uncertain samples”

Da notare che le positività osservate sia a livello molecolare sia sierologico coinvolgono suini appartenenti allo stesso allevamento.

DISCUSSIONI

Il sistema di ricerca molecolare adottato per questa indagine preliminare ha dimostrato essere un metodo diagnostico valido specialmente per i vantaggi che possiede: risultati in breve tempo, specificità e sensibilità elevate. Tuttavia il saggio di PCR ha lo svantaggio di amplificare la sequenza di DNA presente non dimostrando se il microrganismo sia attivo e in grado di duplicarsi. Per questo motivo, l'indagine molecolare può essere affiancata dalla metodica microbiologica tradizionale, considerandola come un supporto all'eventuale positività riscontrata in PCR. Dopo l'amplificazione, infatti, il prearricchito positivo derivante dal campione 992 è stato sottoposto alla metodica microbiologica tradizionale. Nelle piastre di TSA Colavita e di agar sangue si sono osservate diverse colonie, ma nessuna con la morfologia tipica di *E. rhusiopathiae*. Questo deriva dal fatto che il protocollo di PCR identifica come positivo il DNA batterico, ma, esso potrebbe essere stato non vitale e quindi incapace di duplicarsi in coltura. Tale campione corrisponde alla *spongebag* strofinata su cute dopo che la carcassa ha subito il processo di rimozione delle setole tramite trattamento termico e questo potrebbe essere all'origine dell'inattivazione del microrganismo.

Le matrici utilizzate in questo studio sono state le *spongebag* strofinate sulla cotenna e le feci. Queste hanno un duplice vantaggio di essere facilmente reperibili, a differenza di un'altra matrice ampiamente utilizzata in letteratura come le tonsille, considerando il fattore campionamento e di costituire potenziali fonti di infezione zoonosica per gli operatori e di contaminazione dei luoghi di lavoro, considerando i fattori di rischio in sanità pubblica e sicurezza alimentare. Il ritrovamento di *E. rhusiopathiae* sulla cute non permette di definire lo stato di portatore nel soggetto campionato, in quanto si potrebbe trattare di un semplice contaminante ambientale; al contrario ritrovarlo nelle feci da un punto di vista epidemiologico ha una valenza maggiore in quanto il microrganismo può essere trasmesso tramite gli escrementi.

La ricerca sierologica è stata un utile supporto all'indagine diretta in quanto il ritrovamento di anticorpi nel medesimo allevamento ha confermato la circolazione del microrganismo, a livello di gruppo fornendo al contempo una visione generalizzata dello stato epidemiologico degli allevamenti esaminati. Sebbene sia presente una lieve discordanza tra i due kit, tali dati sono allineati con il riscontro PCR. Inoltre la limitatezza delle osservazioni effettuate nel presente studio non consente né una verifica di quanto dichiarato dalle ditte produttrici riguardo alla sensibilità e specificità dei test né una valutazione della loro concordanza. Tuttavia, quantomeno, il dato è univoco ed allineato con il riscontro PCR.

CONCLUSIONI

La maggior parte dei campioni è risultato negativo e questo permette di ipotizzare che *E. rhusiopathiae* sia poco presente all'interno del patrimonio suinicolo territoriale. Tale elemento potrebbe essere spiegato dal sistema di allevamento adottato da parte delle aziende analizzate. Il sistema d'allevamento intensivo, utilizzato dalle stesse, con le correlate misure di profilassi diretta e lo scarso contatto con *reservoir* selvatici e vettori quali roditori e uccelli può in parte spiegare la scarsa presenza di *E. rhusiopathiae* all'interno delle partite analizzate in questo studio. I dati raccolti non sono sufficienti per riportare la prevalenza di tale microrganismo, ma comunque possono essere utili come indagine preliminare per definire un protocollo di ricerca approfondita. Possiamo desumere che *E. rhusiopathiae* sia scarsamente presente negli allevamenti suini intensivi del territorio, ma per avere una conferma di tale affermazione sono necessari ulteriori ricerche.

In conclusione *E. rhusiopathiae* è un agente di zoonosi e pertanto non può essere trascurato il suo impatto sulla sanità pubblica e sulla salute umana. Uno studio sulla sua prevalenza all'interno del patrimonio suinicolo territoriale porterebbe a dei vantaggi *in primis* sulla conoscenza della situazione epidemiologica, ma soprattutto sul controllo nei confronti del microrganismo.

BIBLIOGRAFIA

- Brooke, C. J., & Riley, T. V. (1999). Erysipelothrix rhusiopathiae: Bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J. Med. Microbiol.*, 48(9), 789–799.
- Clark, A. E. (2015). The Occupational Opportunist: An Update on Erysipelothrix rhusiopathiae Infection, Disease Pathogenesis, and Microbiology. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 37(18), 143–151.
- Colavita, G., Vergara, A., & Ianieri, A. (2006). Deferment of slaughtering in swine affected by cutaneous erysipelas. *Meat Sci.*, 72(2), 203–205.
- Craig, L. E., Dittmer, K. E., & Thompson, K. G. (2016). Chapter 2 – Bones and Joints. In *Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals: Volume 1* (6 th, pp. 16– 163). Saunders.
- Opriessnig, T., & Wood, R. L. (2012). Erysipelas. In G. W. S. Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz (Ed.), *Disease of swine* (10 th, pp. 750–759). John Wiley & Sons.
- Reboli, A. C., & Farrar, W. E. (1989). Erysipelothrix rhusiopathiae: An occupational pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2(4), 354–359.
- Takeshi, K., Makino, S., Ikeda, T., Nakashiro, A., Nakanishi, K., Katoh, Y., & Sunagawa, H. (1999). Direct and Rapid Detection by PCR of Erysipelothrix sp. DNAs Prepared from Bacterial Strains and Animal Tissues, *J.clin. Microbiol.* 37(12), 4093–4098.
- Wang, Q., Chang, B. J., & Riley, T. V. (2010). Erysipelothrix rhusiopathiae. *Vet. Microbiol.*, 140(3–4), 405–417.

IMPATTO DELLA MATURITÀ SESSUALE SUL BENESSERE DEL SUINO PESANTE DA INGRASSO DI SESSO FEMMINILE

IMPACT OF SEXUAL MATURITY ON THE WELFARE OF HEAVY FEMALE FATTENERS

DI MARTINO G.¹, SCOLLO A.², GARBO A.¹, LEGA F.¹, STEFANI A.L.¹,
VASCELLARI M.¹, NATALE A.¹, ZULIANI F.¹, ZANARDELLO C.¹, TONON F.³,
BONFANTI L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10,
35020 Legnaro, Padova, Italy;

²Swivet Research s.n.c, Via Martiri della Bettola, 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italy;

³Suivet s.n.c, Via Martiri della Bettola, 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italy

Parole chiave: estro, comportamento sessuale, immunocastrazione

Key words: oestrus, sexual behaviour, immunocastration

Riassunto: Durante l'estro si riporta che le femmine siano più soggette a lesioni legate a conflittualità e comportamento di monta. Questo rappresenta il primo studio che ha indagato gli effetti del comportamento sessuale sul benessere dei suini pesanti di sesso femminile, utilizzando un gruppo di controllo di soggetti immunocastrati. 56 femmine di 15 settimane identificabili individualmente sono state distribuite in 4 baste. Tutti gli animali di 2 baste sono stati sottoposti a 3 dosi di immunocastrazione (a 16, 20 e 32 settimane di età). A 18, 23, 33 e 36 settimane sono stati valutati il comportamento e le lesioni cutanee. A 20, 24, 28 e 32 settimane sono stati effettuati i prelievi ematici per verificare alcuni parametri di salute/stress, progesterone e i livelli anticorpali anti GnRH. Al macello sono stati valutati carcasse, stomaci e polmoni, inoltre è stato prelevato un ulteriore campione ematico e le ovaie sono state pesate, misurate ed esaminate a livello istologico. Il gruppo immunocastrato non ha evidenziato differenze significative di accrescimento, efficienza alimentare e performance di macellazione. Tuttavia hanno mostrato minore frequenza di comportamenti aggressivi a 33 e 36 settimane, minori lesioni all'anteriore a 28 settimane; un più basso livello di aptoglobina a 28 settimane, inferiori livelli di cortisolo e lesioni al posteriore alla macellazione. Questi risultati suggeriscono un non trascurabile impatto della maturità sessuale sul benessere delle femmine da ingrasso.

Abstract: During oestrus, fattening female pigs are more prone to lameness, fractures and wounds due to mounting and agonistic behaviours. This is the first study that assessed the effect of sexual maturity on the behaviour and welfare of heavy female pigs, where an immunocastrated control group was used for comparison. Fifty-six 15-week-old female pigs, individually identifiable were equally distributed among 4 pens. All animals from 2 pens were subject to a 3-dose immunocastration schedule at 16, 20 and 32 weeks of age. Skin lesions and behaviours were assessed at 18, 23, 28, 33 and 36 weeks of age. A blood sample was collected at 20, 24, 28 and 32 weeks of age for assessing health/stress parameters, progesterone and GnRH antibodies. At slaughter, carcasses stomachs and lungs were evaluated and a further blood sample was taken. Ovaries were weighed, measured and histologically examined. Immunocastrated pigs did not significantly differ from controls in growth rate, feed efficiency and slaughter performances (lung score, gastric score, backfat thickness). However, they showed a lower frequency of aggressive interactions at 33 and 36 weeks, lower front lesions at 28 weeks, a lower haptoglobin level at

28 weeks, a lower level of cortisol and back lesions at slaughter. These findings suggest a not negligible impact of sexual maturity on the welfare of heavy female pigs.

INTRODUZIONE

Il fenomeno dell'aggressività rappresenta un importante punto critico per il benessere della specie suina (Rydmer et al., 2006). Questa problematica si manifesta nel periodo post accasamento come conseguenza del rimescolamento di animali appartenenti a gruppi diversi e successivamente in concomitanza con il raggiungimento della maturità sessuale (5-6 mesi). Il comportamento sessuale, caratterizzato da conflitti e azioni di monta rivolte ai conspecifici, è riscontrabile in entrambi i sessi, sebbene nelle femmine sia stato rilevato con una frequenza inferiore (Rydmer et al., 2006). Il comportamento di monta può rappresentare un potenziale problema di benessere per l'aumento di lesioni cutanee e zoppie; elevati livelli di aggressività inducono stress, paura e lesioni non solo nel ricevente, ma in tutti i suini presenti nella bosta (Rydmer et al., 2006, 2010). Uno studio su 408 suini macellati a 116kg ha evidenziato che l'aggressività di origine sessuale era associata al tasso di crescita individuale, inoltre il 15% dei maschi e il 6% delle femmine sono risultati affetti da problemi sanitari (zoppie o fratture) diretta conseguenza di monte e conflitti (Rydmer et al., 2006). Fredriksen and Hexeberg (2009) hanno valutato le interazioni aggressive alla fine dell'ingrasso in maschi e femmine interi e hanno rilevato come queste fossero più frequenti del doppio nei maschi (2,6 vs 1/eventi/capo/ora). Questi autori hanno inoltre verificato un aumento di aggressività a fine ciclo in entrambi i sessi, ma più marcato nei maschi, in risposta alla rimozione di un suino dal box.

Nei soggetti maschi la castrazione chirurgica può contenere tale problematica (Rydmer et al., 2006), tuttavia nel suino pesante italiano i soggetti di sesso femminile (interi) trascorrono circa 2-3 mesi in condizioni intensive dopo il raggiungimento della maturità sessuale. Nonostante non siano disponibili dati scientifici a riguardo, veterinari e allevatori riportano la presenza nel suino pesante italiano di problematiche analoghe a quelle evidenziate negli studi precedentemente citati su suini leggeri quali zoppie, fratture, ferite e morsicature legate al comportamento sessuale. Inoltre, in questo settore produttivo la problematica potrebbe essere presente in entità superiore rispetto al comparto leggero, a causa del maggiore peso degli animali, del raggiungimento della maturità sessuale e delle densità di stabulazione.

Nei suini leggeri maschi alcuni studi hanno esaminato l'effetto dell'immunocastrazione sul comportamento animale (Rydmer et al. 2010; Albrecht, 2013; Brewster e Nevel, 2013;). Questa procedura è caratterizzata da due iniezioni di un vaccino che induce una risposta autoimmune nei confronti del GnRH e un blocco dell'attività sessuale (Albrecht, 2013). A seguito della seconda iniezione, che garantisce l'efficacia del farmaco, i maschi trattati presentavano ridotta aggressività, comportamenti sessuali e di monta, che venivano espletati a frequenze comparabili con maschi castrati e femmine intere. Attualmente risultano invece carenti gli studi sull'effetto dell'immunocastrazione sul comportamento delle femmine macellate oltre i 160kg di peso nell'ambito della realtà italiana.

Sulla base di questi presupposti lo scopo di questo studio è stato di valutare l'impatto delle manifestazioni estrali sul benessere dei suini pesanti da ingrasso di sesso femminile attraverso una prova sperimentale di campo con creazione di un gruppo controllo costituito da suini immunocastrati.

MATERIALI E METODI

In un sito commerciale di circa 2000 capi, 56 suini ibridi commerciali di sesso femminile di 15 settimane di vita sono stati casualmente ripartiti in 4 baste (6.5×2.4 m) con pavimento

fessurato in calcestruzzo con truogolo lineare (6.5 ×0.3 m). Tutti i suini selezionati per la prova risultavano vaccinati contro PRRS, Circovirus e Malattia di Aujeszky. Al momento dell'accasamento ogni singolo animale è stato identificato con tatuaggio dorsale al fine di mantenere la tracciabilità dei dati provenienti da ogni individuo nel corso della prova. L'alimento, sotto forma di pastone liquido, è stato fornito 4 volte al giorno (ore: 7.00-10.30-14.00-18.00). Gli animali sono stati trasportati al macello a 36 settimane di vita (180±10kg) lo stesso giorno tra le 6.00 e le 7.00 presso un impianto a 30 km di distanza dall'allevamento e macellati tra le 8.00 e le 9.00. I gruppi non sono stati mescolati durante trasporto e sosta pre-macellazione. Gli animali del gruppo di controllo sono stati sottoposti a vaccinazione con somministrazione del farmaco immunizzante registrato in Spagna (Vacsincel - Zoetis, Madrid, Spagna) e introdotto in deroga con autorizzazione ministeriale 0017714-07/07/2015-DGSAF. Sono state effettuate tre iniezioni a 16, 20 e 32 settimane di vita sulla base del protocollo di Dalmau et al. (2015). Sono stati effettuati prelievi ematici a 16, 20, 24, 28 e 32 settimane. Il sangue è stato prelevato la mattina (9:00-10:00 a.m.) dalla vena giugulare. Un ulteriore prelievo è stato raccolto al momento della macellazione dall'incisione giugulare.

I campioni sono stati conservati a 4°C durante il trasporto al laboratorio, centrifugati a 2400xg per 10 minuti a 20°C e stoccati a -20°C per le successive analisi. La determinazione quantitativa di progesterone nel siero di sangue suino è stata effettuata mediante cromatografia liquida/spettrometria di massa tandem dopo purificazione del campione in Solid Phase Extraction (SPE). La determinazione degli anticorpi anti-GnRH è stata effettuata tramite un test ELISA, secondo una metodica precedentemente utilizzata da Claus et al. (2007) e in parte riadattata.

Sono state effettuate 5 sessioni di valutazione comportamentale a 18, 23, 28, 33, 36 settimane di vita. Ciascuna sessione di analisi comportamentale aveva la durata di 2 ore ininterrotte nel corso della giornata (11.00-13.00). In particolare, la rilevazione veniva effettuata 30 minuti dopo la somministrazione del pasto e almeno 10 giorni dopo le procedure di vaccinazione/prelievo ematico. La valutazione comportamentale è stata effettuata attraverso due diverse metodiche: 1) la tecnica dello scan sampling (Martin e Bateson, 2007) con intervallo di scansione di due minuti è stata utilizzata per registrare, per ciascun animale, l'espletamento di una delle seguenti attività: locomotoria, sociale positiva, sociale negativa, abbeverata, interazione con gli arricchimenti ambientali, inattività, altro (etogramma adattato sulla base dello studio di Scollo et al. 2013 e Thomsen et al., 2012). 2) La tecnica del continuous behaviour sampling (Martin e Bateson, 2007) è stata utilizzata per conteggiare quante volte si manifestavano in ciascun animale i seguenti comportamenti considerati come privi di durata (eventi): morde la coda, morde le orecchie, innesca un conflitto, mastica a vuoto, belly nosing, monta un conspecifico. Le lesioni cutanee sono state valutate a 18, 23, 28 e 33 settimane di vita su anteriore, posteriore e orecchie in accordo con il metodo proposto dal Protocollo Welfare Quality (Welfare Quality, 2009) ed è stato riportato il numero di lesioni per ciascuna area topografica. Il punteggio gastrico e polmonare è stato attribuito in accordo con i metodi proposti rispettivamente da Di Martino et al. (2013) e Scollo et al. (2017).

Dopo la macellazione sono stati raccolti l'utero e le ovaie di ciascun animale. Per ciascun animale è stata eseguita l'analisi istologica su entrambe le ovaie e su un campione rappresentativo di utero. Le ovaie sono state pesate prima di essere fissate in formalina 10% neutra tamponata. Ogni campione è stato poi regolarmente processato, incluso in paraffina e tagliato al microtomo al fine di ottenere sezioni dello spessore di 3-5 micron, colorate successivamente con ematossilina ed eosina. L'analisi istologica è stata eseguita valutando la presenza di follicoli, lo stadio di sviluppo degli stessi e la presenza di corpi lutei.

Modelli lineari misti o regressione di Poisson sono stati utilizzati per esaminare le differenze

in base al trattamento sperimentale nelle variabili a misure ripetute (parametri ematici, comportamenti, lesioni cutanee). Le analisi sono state effettuate con il software STATA 11.2 (StataCorp, College Station, TX). Tutte le procedure sperimentali sono state effettuate nel rispetto della normative vigente sulla protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali, inoltre lo studio ha ricevuto parere favorevole da parte del Comitato Etico dell'IZSVE (CE. IZSVE.07/2014).

RISULTATI

Complessivamente gli animali di entrambi i gruppi non hanno presentato problematiche sanitarie specifiche e sono stati regolarmente inviati alla macellazione. I risultati delle performance produttive e dei dati raccolti al macello sono forniti in Tab. 1.

A livello istologico, in entrambi i gruppi la corticale ovarica presentava follicoli in diversi stadi di maturazione (dallo stadio primordiale a quello maturo). I follicoli maturi apparivano più piccoli nelle femmine immunocastrate (0.4-1.7 mm) rispetto alle femmine intere (2.2-7.2 mm) e non visibili macroscopicamente; inoltre la massima dimensione follicolare era significativamente inferiore ($P<0.001$). Per quanto riguarda i corpi lutei, questi erano presenti in 19 scrofette non trattate e in 2 trattate. I titoli anticorpali sono risultati significativamente più elevati ($P<0,05$) nel gruppo vaccinato a 24 settimane di vita (4 settimane dopo la seconda iniezione). Nelle femmine intere rispetto alle vaccinate è stato osservato un aumento significativo ($P<0,001$) del progesterone dalle 32 alle 36 settimane (fino a 65,4 pg/mL), mentre in entrambi i gruppi i livelli erano molto bassi fino a 20-28 settimane ($0,2 \pm 1,5$ pg/mL).

I risultati dei principali comportamenti sono riportati in Fig.1. Il comportamento inattivo e il comportamento sociale positivo non hanno mostrato differenze significative in base al trattamento sperimentale ($P=0,766$ and $P=0,795$, rispettivamente). Le interazioni aggressive sono state significativamente più frequenti nel gruppo non vaccinato a 33 e 36 settimane di vita ($P<0,05$). Inoltre il gruppo non vaccinato ha presentato maggiori lesioni a 28 settimane sull'area anteriore, ma meno a 30 settimane ($P<0,001$ e $P=0018$, rispettivamente). Infine questo gruppo a 28 settimane ha mostrato una tendenza ($P=0,07$) verso un maggior numero di lesioni al posteriore e un maggiore livello di aptoglobina sierica ($P=0,001$).

La maggior parte dei comportamenti oggetto di interesse sono stati espletati a una frequenza molto bassa. In particolare, il comportamento di monta è stato rilevato a una frequenza di 0,01 vs 0,03 eventi/capo/ora nel gruppo vaccinato rispetto al controllo.

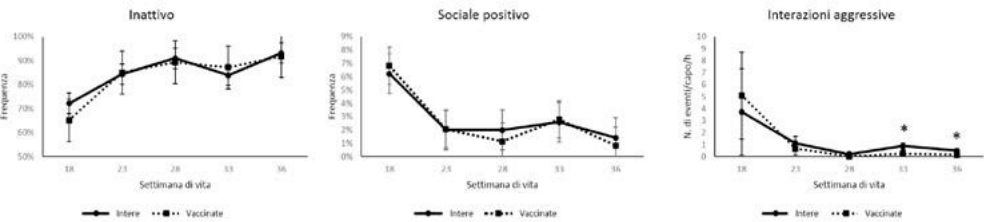


Fig 1. Effetto dell'immunocastrazione in suini pesanti di sesso femminile sulla frequenza del comportamento inattivo, del comportamento sociale positive e delle interazioni aggressive. Gli asterischi indicano una differenza statisticamente significativa ($P<0,05$). Risultati come media e 95%IC.

Tab. 1. Effetto della vaccinazione contro Gn-RH in suine femmine pesanti (intere vs. vaccinate) sui parametri produttivi e fisiologici relativi alla fase di macellazione (36 settimane di vita). Significatività per $P<0,05$.

	Femmine intere	Femmine immunocastrate	P
	media (DS ¹)	mean (DS ¹)	
Accrescimento medio die, kg	0,98 (0,16)	0,98 (0,14)	0,84
Efficienza alimentare, %	0,34 (0,02)	0,34 (0,02)	0,53
Spessore grasso, mm	29,96 (4,72)	29,52 (5,37)	0,78
Carne magra, %	51,98 (2,13)	52,17 (2,39)	0,78
Peso ovaie, g	7,85 (3,33)	1,32 (0,73)	<0,001
Lunghezza ovaie, cm	27,88 (5,53)	16,27 (3,56)	<0,001
Cortisolo, nmol/L	92,33 (49,04)	63,84 (29,86)	0,03
Rapporto Alb/Glo	0,75 (0,08)	0,76 (0,09)	0,86
Aptoglobina, mg/dL	91,33 (35,58)	96,93 (41,5)	0,59
Score polmoni (scala 0-24)	2,33 (2,25)	2,18 (2,29)	0,76
Score stomaci (scala 0-3)	0,44 (0,58)	0,79 (0,74)	0,12
Anteriore, n. di lesioni	2,85 (2,14)	1,61 (1,59)	0,17
Posteriore, n. di lesioni	1,59 (1,78)	1,00 (1,22)	0,05
Orecchie, n. di lesioni	1,74 (1,81)	1,11 (1,40)	0,61

¹ deviazione standard

DISCUSSIONE

Le conseguenza della castrazione chirurgica e dell'immunocastrazione sono state precedentemente indagate in suini maschi e la maggior parte degli studi concorda su un complessivo decremento dei comportamenti aggressivi e di monta (Zamaratskaia et al., 2007; Baumgartner, 2010; Rydhmer et al., 2006, 2010; Brewster et al., 2013). Nel presente studio verso fine ciclo è stata osservata una maggiore frequenza di interazioni aggressive nelle femmine intere rispetto alle immunizzate, oltre alla tendenza a una maggiore frequenza di interazioni sociali a 28 e 36 settimane, in accordo con quanto precedentemente riportato per i suini maschi (Rydhmer et al., 2006). Inoltre, nel gruppo non vaccinato, a 28 settimane è stata osservata una maggiore presenza di lesioni al posteriore ed è stato rilevato un livello superiore di aptoglobina sierica, proteina positiva di fase acuta già ampiamente utilizzata come indicatore di benessere nei suini (Petersen et al., 2004; Scollo et al., 2013). Il livello più elevato di aptoglobina potrebbe essere imputabile alla maggiore frequenza di interazioni aggressive e lesioni cutanee. In fase di macellazione, ovvero in risposta a un significativo stress legato a carico, trasporto e sosta, viene confermata la maggiore nevrilità delle femmine intere, che hanno presentato un più elevato livello di cortisolo e lesioni cutanee sul posteriore.

Il protocollo di immunocastrazione è stato applicato in accordo con Dalmau et al. (2015) e come atteso i titoli anticorpali sono risultati significativamente più elevati 2 settimane dopo la seconda iniezione. La valutazione macroscopica delle ovaie dopo la macellazione supporta l'ipotesi che i trattamenti sperimentali siano avvenuti correttamente. A livello istologico, tuttavia, non è stata osservata una totale assenza di ciclazione, ma piuttosto una incapacità di maturazione dei follicoli, con conseguente mancanza di ovulazione e produzione di corpi lutei (eccetto due soggetti). Inoltre i follicoli osservati istologicamente, a parità di stadio maturativo, risultavano di dimensioni inferiori rispetto a quelli delle femmine intere. Gli animali di entrambi i gruppi sperimentali hanno raggiunto il peso di macellazione richiesto nell'intervallo di tempo atteso in questo contesto produttivo (circa 36 settimane per un minimo di 160 kg di peso) con un tasso di mortalità prossimo allo zero e performance di macellazione adeguate. In particolare non sono state evidenziate differenze significative riguardo a efficienza alimentare, accrescimento medio giornaliero, spessore di grasso superficiale e percentuale di carne magra. Questo dato è in disaccordo con precedenti studi su suini iberici che hanno invece evidenziato un maggiore spessore di grasso nelle femmine immunizzate rispetto alle intere (Gamero-Negrón et al., 2015). La differenza potrebbe essere attribuita ai diversi sistemi produttivi, alla genetica e ai programmi alimentari. In accordo con Van den Broeke et al. (2016), l'efficienza alimentare non è stata influenzata dal trattamento.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio indicano un non trascurabile effetto della maturità sessuale sul benessere dei suini pesanti di sesso femminile e una riduzione degli effetti negativi ad essa legati attraverso l'utilizzo di immunocastrazione. Questa evidenza supporta il possibile utilizzo futuro del farmaco (attualmente non disponibile sul mercato italiano) per una migliore gestione dei gruppi in corrispondenza di situazioni particolarmente critiche, ma non per migliorare le performance produttive. Un ulteriore utilizzo del farmaco potrebbe essere nell'ambito delle piccole produzioni, dove la tradizione prevede che gli animali non vengano macellati durante la fase estrale per ottenere prodotti idonei. Infine, l'utilizzo sarebbe consigliabile nei sistemi estensivi all'aperto, dove le scrofette in calore potrebbero rappresentare una fonte di attrazione per i cinghiali, con conseguente rischio di diffusione di patogeni e di generare prole di difficile gestione, come riportato nei sistemi produttivi spagnoli (Dalmau et al., 2015).

BIBLIOGRAFIA

Albrecht A.K. (2013). Review on the consequences of using ImprovacTM in modern pig production. *Veterinary Science Development* 3, e1.
 Brewster V. and Nevel A. (2013). Immunocastration with ImprovacTM reduces aggressive and sexual behaviours in male pigs. *Appl An Behav Sci* 145, 32–36.
 Claus R., Lacorn M., Danowski K., Pearce M.C. and Bauer A. (2007). Short-term endocrine and metabolic reactions before and after second immunization against GnRH in boars. *Vaccine* 25, 4689–4696.
 Dalmau A., Velarde A., Rodríguez P., Pedernera C., Llonch P., Fàbrega E., Casal N., Maianu E., Gispert M., King V., Sloomans N., Thomas A. and Mombarg M. (2015). Use of an anti-GnRH vaccine to suppress estrus in crossbred Iberian female pigs. *Theriogenol* 84, 342–347.
 Di Martino G., Capello K., Scollo A., Gottardo F., Stefani A.L., Rampin F., Schiavon E., Marangon S. and Bonfanti L. (2013). Continuous straw provision reduces prevalence of oesophago-gastric ulcer in pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs). *Res Vet Sci* 95, 1271–1273.

Di Martino G., Scollo A., Gottardo F., Stefani A.L., Schiavon E., Capello K., Marangon S. and Bonfanti L. (2015). The effect of tail docking on the welfare of pigs housed under challenging conditions. *Livest Sci* 173, 78–86.
 Fredriksen B. and Hexeberg C. (2009). The effect of removing animals for slaughter on the behaviour of the remaining male and female pigs in the pen. *Res Vet Sci* 86, 368–370.
 Gamero-Negrón R., Del Pulgar J.S., Ventanas J. and García C. (2015). Immune-spaying as an alternative to surgical spaying in Iberian × Duroc females: Effect on carcass traits and meat quality characteristics. *Meat Sci* 99, 99–103.
 Martin P. and Bateson P. (2007). *Measuring behaviour*. 3rd edition Cambridge University Press, Cambridge, UK.
 Petersen H.H., Nielsen J.P. and Heegard P.M.H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 35, 163–187.
 Rydhmer L., Lundström K. and Andersson K. (2010). Immunocastration reduces aggressive and sexual behaviour in male pigs. *Animal* 6, 965–72.
 Rydhmer L., Zamaratskaia G., Andersson H.K., Algers B., Guillemet R. and Lundström K. (2006). Aggressive and sexual behaviour of growing and finishing pigs reared in groups, without castration. *Acta Agric. Scand. Sect. A-Anim. Sci.* 56, 109–19.
 Scollo A., Di Martino G., Bonfanti L., Stefani A.L., Schiavon E., Marangon S. and Gottardo F. (2013). Tail docking and the rearing of heavy pigs: the role played by gender and the presence of straw in the control of tail biting. Blood parameters, behaviour and skin lesions. *Res Vet Sci* 95, 825–830.
 Scollo A., Gottardo F., Contiero B., Mazzoni C., Leneveu P. and Edwards S.A. (2017). Benchmarking of pluck lesions at slaughter as a health monitoring tool for pigs slaughtered at 170kg (heavy pigs). *Prev Vet Med* 144, 20-28.
 Van den Broeke A., Leen F., Aluwé M., Ampe B., Van Meensel J. and Millet S. (2016). The effect of GnRH vaccination on performance, carcass, and meat quality and hormonal regulation in boars, barrows, and gilts. *J Anim Sci* 94, 2811-2820.
 Welfare Quality[®] 2009. Welfare Quality[®] applied to growing and finishing pigs. In Welfare Quality[®] assessment protocol for pigs (ed. A Dalmau, A Velarde, K Scott, S Edwards, I Veissier, L Keeling and A Butterworth), pp. 49-78. Welfare Quality[®] Consortium, The Netherlands.
 Zamaratskaia G., Rydhmer L., Andersson H.K., Chen G., Lowagie S., Andersson K. and Lundström K. (2007). Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using immunisation against GnRH, on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Anim Reprod Sci* 108, 37–48.

VERIFICA E PREVENZIONE DEL RISCHIO BIOLOGICO IN SUINICOLTURA. UNA PROPOSTA OPERATIVA

BIOLOGICAL RISK ASSESSMENT IN PIG FARMING AN OPERATIVE PROPOSAL

GUADAGNO F. ¹, SALA V. ²

¹ Scuola di Specializzazione in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche -
Università degli Studi di Pisa

² Dipartimento di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Milano

Parole chiave: zoonosi, rischio occupazionale biologico, suinicoltura.

Key words: *zoonosis, biological occupational risk, pig farming.*

Riassunto: Il rischio biologico zoonotico in suinicoltura assume sostanzialmente una configurazione occupazionale. Per valutarlo in modo efficace è necessario conoscere le caratteristiche epidemiologiche dei patogeni coinvolti, ma è indispensabile correlare queste informazioni con l'attività degli operatori, considerando il rischio espositivo nel tempo e nello spazio, il loro stato di salute, i possibili danni e l'efficacia delle misure preventive applicate. A questo scopo è stata progettata e realizzata di una lista di riscontro (check-list), da applicare in allevamento e in macello per valutare entità e cause del rischio espositivo, anche rispetto alle soluzioni di controllo e prevenzione già in essere. Un approccio corretto ed esaustivo del problema deve prevedere la collaborazione dei veterinari con i medici del lavoro, in una prospettiva One Health.

Abstract: The zoonotic biological risk in pig farming has a noticeably occupational configuration. The knowledge of the epidemiology of the involved pathogens is required. The correlation of this information with the operators' activity is also essential, considering their exposure risk, state of health and the effectiveness of the preventive applied measures. For this purpose a checklist exploitable in farming and slaughter facilities to evaluate the extent of occupational biological risk has been designed and assembled. Prevention and risk control require the collaboration of veterinarians with occupational physicians, in a One Health perspective.

INTRODUZIONE

Il rischio biologico per gli operatori a qualsiasi titolo nel settore agro-zootecnico non è sufficientemente considerato, soprattutto per quanto riguarda la possibilità di contrarre e sviluppare malattie di origine zoonotica nell'ambito occupazionale e nelle consuete attività lavorative; la terminologia "zoonosi occupazionale" configura un rischio correlato all'ambito operativo più che al tipo di mansione e perciò i suoi determinanti non sono più rappresentati dal semplice contatto con gli animali, quanto piuttosto dalle modalità, anche temporali, di esposizione, dall'entità delle cariche infettanti e dallo stato di salute/recettività degli individui esposti.

In una visione più onnicomprensiva del rischio, oltre agli operatori continuativamente a contatto con gli animali, come veterinari (in allevamento, macello o ambulatorio), allevatori e personale di allevamento e macellatori, dev'essere considerato anche chi frequenta occasionalmente o saltuariamente le produzioni animali, come ad esempio manutentori, trasportatori

e valutatori a qualsiasi titolo; non è errato affermare che queste categorie occupazionali possono essere in condizioni di maggiore recettività, in forza di una minore “continuità espositiva” rispetto a quelle sempre presenti in allevamento.

L’ambito suinicolo è particolarmente adatto a consolidare questo schema epidemiologico, soprattutto per la capacità del suino nel mantenimento e nella diffusione degli agenti zoonosici tradizionali, ma anche nella selezione di nuovi potenziali patogeni: infatti, secondo l’Organizzazione Mondiale della Sanità, il 70% delle zoonosi emergenti negli ultimi 30 anni sono di origine suina.

Nella prima fase del nostro studio, sono stati considerati gli agenti zoonosici principalmente presenti e circolanti nel sistema suinicolo italiano: *virus dell’Epatite E*, *Chlamydia suis*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus suis*, *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente(M.R.S.A), *Leptospira interrogans*, *Salmonella Enterica e Yersinia enterocolitica*; in una prospettiva di analisi del rischio occupazionale degli addetti all’allevamento e alla macellazione, per ciascuno di essi sono stati evidenziati i fattori di amplificazione, con l’obiettivo di accertare in modo oggettivo, riproducibile e ripetibile, presenza ed entità del rischio stesso, soprattutto in una prospettiva di applicazione e calibrazione delle misure preventive.

Su questi presupposti è stato sviluppato lo strumento che proponiamo in questo studio, perché solo con un sistema di rilevazione condiviso in termini di applicazione e standardizzato in allevamento e in macello, si possono identificare i fattori del rischio biologico per gli operatori; esso consiste in una lista di riscontro (check-list), che tenendo conto di tutti gli aspetti epidemiologici delle infezioni zoonosiche di derivazione suina, rileva e analizza i fattori che le amplificano nei sistemi aziendali in cui è applicata.

MATERIALI E METODI

Progettazione e realizzazione di due liste di riscontro per la valutazione del rischio biologico espositivo degli operatori nell’allevamento suinicolo e al macello sono dunque state l’oggetto del lavoro si cui riportiamo i risultati; una check-list (lista di controllo o di riscontro) può essere usata per controllare come un’attività è stata eseguita o ancora per verificare se un determinato processo è stato applicato in modo corretto: quest’ultima è l’applicazione più utilizzata in campo sanitario, dove può oggettivare le rilevazioni, liberandole dalle interferenze personali e rendendo quindi uniformi i dati, che diventano facilmente confrontabili nel tempo (nel nostro caso, nella stessa azienda) e nello spazio (tra le aziende).

Il nostro lavoro, che si è basato anche sull’esperienza acquisita nella valutazione dei Sistemi di Qualità Interna (SQI) dell’ambito ISO, si è dunque proposto di calibrare il metodo sui processi della produzione suinicola, per individuare tutti i passaggi che generano le criticità del rischio biologico; al contempo, ci siamo prefissi di mantenere maneggevolezza, rapidità d’impiego e fruibilità da parte degli addetti ai rilievi.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Al fine di acquisire le informazioni con una sequenza logica e coerente, la lista di riscontro per l’allevamento suinicolo (Tabella 1) è stata suddivisa in cinque sottosezioni: la prima riporta le informazioni generali utili a identificare le caratteristiche aziendali, i problemi sanitari e l’organizzazione della gestione preventiva e terapeutica delle patologie eventualmente presenti; le sezioni successive riguardano le diverse fasi del ciclo produttivo (gestazione e sala parto, svezzamento, magronaggio e ingrasso) e mirano ad acquisire, in modo preciso e sintetico, le informazioni sull’origine dei rischi biologici di ciascuna e sull’efficacia delle misure di controllo eventualmente applicate.

Per ottenere tutte le possibili informazioni su eventuali forme cliniche di origine zoonosica già comparse o diagnosticate negli operatori di allevamento e su eventuali screening sierologici eseguiti, è stata infine inserita una sezione aggiuntiva, alla quale possono essere volontariamente allegate le documentazioni del caso.

In tutte le unità che compongono la lista di riscontro, è stata preferita la soluzione dei quesiti chiusi, con risposte predeterminate da barrare preferenzialmente, considerando soprattutto che la maggior difformità delle risposte alle domande aperte comporta più problemi in fase di analisi. Per agevolare gli utilizzatori, sono stati considerati i punti critici salienti e le metodologie applicabili a controllo e prevenzione nelle fasi di allevamento e al macello, mentre per ogni quesito della lista, è stata inserita una breve sintesi degli obiettivi attesi dalla risposta.

Nelle prove preliminari finora eseguite in condizioni controllate, le liste di riscontro si sono dimostrate maneggevoli, facili da utilizzare e poco impegnative in termini di tempo richiesto per la compilazione; per di più, hanno fornito un’informazione indicativa e facilmente analizzabile, anche in sede di confronto. In previsione di un’applicazione su scala più ampia, la compilazione delle liste sarà compito dei responsabili delle strutture di allevamento e macello, che sono i soli depositari di tutte le informazioni necessarie.

Tabella 1. Lista Di Riscontro Del Rischio Biologico Infettivo In Allevamento
Table 1. Check-list for the evaluation of Biological Infectious Risk in Pig Farming

INFORMAZIONI SULL’ALLEVAMENTO

RAGIONE SOCIALE	
VETERINARIO AZIENDALE	
N° DIPENDENTI	Tempo pieno
	Part-time

INFORMAZIONI AZIENDALI

TIPO DI ALLEVAMENTO	☐ Ciclo chiuso	☐ Ciclo aperto	☐ Ingrasso
N°DI CAPI	N° scrofe:		
	Ingrasso N° posti:		
STRUTTURE DEDICATE PER FASI	☐ Gestazione		
	☐ Sala Parto		
	☐ Svezzamento		
	☐ Magronaggio		
	☐ Ingrasso		
	☐ Infermeria		
	☐ Quarantena		
QUOTA DI RIFORMA	Ipofertilità:		
	UTI:		
	Malattie podali:		

SCROFE

TIPO DI PARTO	Normale	☐ SI	☐ NO
	Indotto	☐ SI	☐ NO
	Assistito	☐ SI	☐ NO
N° ADDETTI			

LATTONZOLI

INTERVENTI PROGRAMMATI	Castrazione	☐ SI	☐ NO
	Taglio della coda	☐ SI	☐ NO
	Troncatura o levigatura dei denti	☐ SI	☐ NO
PATOLOGIE PRESENTI	Enteriti	☐ SI	☐ NO
	Forme sistemiche (compresa Meningite)	☐ SI	☐ NO

SVEZZATI

ETA' SVEZZAMENTO:					
PATOLOGIE PRESENTI	☐ Enteriti	☐ SI	☐ NO	☐ Gruppo	☐ Singolo
	☐ Meningiti	☐ SI	☐ NO	☐ Gruppo	☐ Singolo
	☐ Epidermiti	☐ SI	☐ NO	☐ Gruppo	☐ Singolo
	☐ Malattia di Glässer	☐ SI	☐ NO	☐ Gruppo	☐ Singolo

MAGRONAGGIO E INGRASSO

TUTTO PIENO/ TUTTO VUOTO	☐ SI	☐ NO
MODALITA' DI RISTALLO	☐ SI	
	☐ SI	
PATOLOGIE PRESENTI	☐ SI	
	☐ Enteropatie	

GESTAZIONE

<i>Rischio</i>	<i>Misura preventiva</i>	<i>Applicazione</i>		<i>Indicazione</i>
Introduzione di nuove infezioni in allevamento	Impiego della quarantena	☐ SI	☐ NO	Il mantenimento in isolamento degli animali in ingresso consente di verificare il loro stato sanitario
Diffusione delle infezioni lungo i cicli di produzione e tra i gruppi di animali	Pulizia e disinfezione delle strutture prima di ogni nuova introduzione (tutto pieno – tutto vuoto)	☐ SI	☐ NO	Riduzione della carica infettante di origine ambientale
Introduzione di nuove infezioni in allevamento	Visita veterinaria degli animali in arrivo e prelievi a campione per la verifica della presenza di infezioni a potenziale zoonosico	☐ SI	☐ NO	La verifica clinica e sieroepidemiologica permette di stabilire lo stato di portatore/ eliminatore dei riproduttori di nuova introduzione
Contatto con animali portatori eliminatori di agenti zoonosici	Attrezzature e strumenti per evitare il contatto diretto suino-operatore	☐ SI	☐ NO	Evitare il contatto fisico con gli animali (soprattutto durante gli spostamenti) riduce il rischio di contagio
Diffusione delle infezioni da parte di roditori e artropodi	Derattizzazione e demuscazione regolarmente applicate	☐ SI	☐ NO	Roditori e artropodi possono fungere da <i>reservoir</i> e diffondere le infezioni agli animali e al personale
Rischio di agenti zoonosici nel pulviscolato e nelle feci	Verifica dei ricambi d'aria e corretto funzionamento delle pavimentazioni in grigliato	☐ SI	☐ NO	La salubrità dell'aria è fornita da un corretto funzionamento degli impianti di ventilazione. La pulizia programmata dei grigliati riduce la fecalizzazione ambientale

Diffusione feco-orale dei batteri enteropatogeni	Pulizia regolare degli impianti di alimentazione e abbeverata	☐ SI	☐ NO	La diffusione delle infezioni attraverso la contaminazione fecale di acque e alimenti aumenta le cariche infettanti nell'ambiente
Rischio d'infezione attraverso la manipolazione dell'animale	Impiego corretto e regolare dei DPI: abiti da lavoro, guanti, grembiuli impermeabili, occhiali e mascherine	☐ SI	☐ NO	Il rischio infettivo nel contatto con l'animale è di derivazione cutanea, ematica, respiratoria e fecale
Mantenimento e amplificazione del rischio infettivo	Controllo del sovraffollamento, rispettando le indicazioni normative	☐ SI	☐ NO	La densità animale aumenta la microbizzazione ambientale e quindi il rischio infettivo

SALA PARTO

<i>Rischio</i>	<i>Misura preventiva</i>	<i>Applicazione</i>		<i>Indicazione</i>
Diffusione delle infezioni lungo i cicli di produzione e tra i gruppi di animali	Pulizia e disinfezione delle sale e delle gabbie parto prima di ogni nuova introduzione. Applicazione del tutto pieno – tutto vuoto	☐ SI	☐ NO	Riduzione della contaminazione ambientale. Prevenzione dalla moltiplicazione e trasmissione dei patogeni
Possibili infezioni nelle operazioni di assistenza al parto	Impiego dei DPI nelle operazioni di assistenza al parto: abiti da lavoro, guanti, grembiuli impermeabili, occhiali e mascherine	☐ SI	☐ NO	Il rischio infettivo durante l'assistenza al parto deriva dal contatto con neonati, invogli fetali e secondamento
Contaminazione ambientale nel periparto	Impiego di contenitori impermeabili a doppio strato per la raccolta dei materiali residui del parto	☐ SI	☐ NO	Placente, feti e suinetti morti possono essere veicolo di contagio di infezioni zoonosiche

SVEZZAMENTO

<i>Rischio</i>	<i>Misura preventiva</i>	<i>Applicazione</i>		<i>Indicazione</i>
Diffusione delle infezioni lungo i cicli di produzione e tra i gruppi di animali	Pulizia e disinfezione delle strutture prima di ogni nuova introduzione (tutto pieno – tutto vuoto)	☐ SI	☐ NO	Riduzione della carica infettante di origine ambientale. Prevenzione dalla moltiplicazione e trasmissione dei patogeni
Contatto con animali portatori eliminatori di patogeni zoonosici	Attrezzature e strumenti per evitare il contatto diretto suino-operatore	☐ SI	☐ NO	Evitare il contatto fisico con gli animali (soprattutto durante gli spostamenti) riduce il rischio di contagio
Contatto con feci, sangue e liquidi biologici	Durante le operazioni di assistenza e gli interventi cruenti, impiegare sempre tutti i DPI necessari. Utilizzare bisturi elettrici che evitino la dispersione di sangue	☐ SI	☐ NO	Le operazioni e gli interventi sugli animali, aumentano lo stato di stress e quindi l'eliminazione di eventuali patogeni zoonosici

MAGRONAGGIO E INGRASSO

<i>Rischio</i>	<i>Misura preventiva</i>	<i>Applicazione</i>		<i>Indicazione</i>
Eliminazione di patogeni come conseguenza dello stress da trasporto	Destinazione di una parte dei box all'acclimatazione dei lattoni in arrivo (negli allevamenti di solo ingrasso). Uso dei DPI	☐ SI	☐ NO	In fase di acclimatazione gli animali possono eliminare agenti infettanti di cui sono portatori
Diffusione delle infezioni lungo i cicli di produzione e tra i gruppi di animali	Pulizia e disinfezione dei box di ogni nuova introduzione (tutto pieno – tutto vuoto)	☐ SI	☐ NO	Riduzione della carica infettante ambientale di possibile origine zoonosica

Introduzione di nuove infezioni in allevamento; rischio di infezione per gli addetti	Visita veterinaria degli animali in arrivo e prelievi a campione per la verifica della presenza di infezioni a potenziale zoonosico	☐ SI	☐ NO	Il controllo clinico e sieroepidemiologico permette di verificare lo stato di portatore/eliminatore degli animali di nuova introduzione
Contatto con animali portatori eliminatori di agenti zoonosici	Attrezzature e strumenti per evitare il contatto diretto suino-operatore	☐ SI	☐ NO	Evitare il contatto fisico con gli animali (soprattutto durante gli spostamenti) riduce il rischio di contagio
Diffusione delle infezioni da parte di roditori e artropodi	Derattizzazione e demuscazione regolarmente applicate	☐ SI	☐ NO	Roditori e artropodi possono fungere da <i>reservoir</i> e diffondere le infezioni agli animali e al personale
Rischio di agenti zoonosici nel pulviscolato e nelle feci	Verifica dei ricambi d'aria e corretto funzionamento delle pavimentazioni in grigliato	☐ SI	☐ NO	La salubrità dell'aria è fornita da un corretto funzionamento degli impianti di ventilazione. La pulizia programmata dei grigliati riduce la fecalizzazione ambientale
Diffusione feco-orale dei batteri enteropatogeni	Pulizia regolare degli impianti automatici di alimentazione e abbeverata	☐ SI	☐ NO	La diffusione delle infezioni attraverso la contaminazione fecale di acque e alimenti aumenta le cariche infettanti nell'ambiente
Mantenimento e amplificazione del rischio infettivo	Controllo del sovraffollamento, rispettando le indicazioni normative	☐ SI	☐ NO	La densità animale aumenta la microbizzazione ambientale e quindi il rischio infettivo

Rischio d'infezione attraverso le feci e la contaminazione dell'aria	Impiego corretto e regolare dei DPI. In particolare protezione respiratoria attraverso mascherina	☐ SI	☐ NO	La permanenza delle strutture comporta un rischio respiratorio derivato dalla microbizzazione e della presenza di biogas
Rischio di contaminazione delle carcasse, pericolo per la salute umana	Visita sanitaria prima dell'invio al macello	☐ SI	☐ NO	Accertare l'assenza di segni che indicano una compromissione del benessere animale o condizioni che si ripercuotono sulla salute umana

INDICATORI ADDIZIONALI DI RISCHIO

<i>Rischio</i>	<i>Misura preventiva</i>	<i>Applicazione</i>		<i>Indicazione</i>
Presenza di infezioni zoonosiche occulte in allevamento	Presenza di segnalazioni da parte del macello e ASL – Considerazione ai fini del rischio occupazionale	☐ SI	☐ NO	La segnalazione della presenza di agenti zoonosici al macello indica la necessità di potenziare la protezione degli operatori in allevamento
Presenza d'infezioni asintomatiche o subcliniche nel personale di allevamento	Esami sierologici e/o ricerche mirate di patogeni zoonosici sul personale di allevamento	☐ SI	☐ NO	Valutare lo stato di recettività/ protezione nei confronti delle infezioni zoonosiche modula l'entità del rischio

La lista di riscontro del rischio biologico occupazionale per gli operatori negli stabilimenti di macellazione (Tabella 2), è inevitabilmente più sintetica; ciò non significa evidentemente che i rischi siano minori, perché la provenienza dei suini macellati è molto differente, così come la loro situazione epidemiologica in termini di localizzazione ed eliminazione degli agenti patogeni zoonosici.

Il processo di macellazione è stato valutato rispetto alla numerosità dei capi processati, al tempo di presenza e all'attività degli operatori, considerando gli elementi più critici del rischio rispetto alla manipolazione dell'animale in vita, all'eviscerazione e al sezionamento della carcassa. Infine, giova ricordare che, in allevamento e nello stabilimento di macellazione, particolare

attenzione è stata riservata alla correttezza e alla regolarità dell’impiego dei dispositivi di protezione individuale (DPI), che continuano a rappresentare un caposaldo fondamentale nella prevenzione del rischio biologico zoonosico; sono state ugualmente considerate l’organizzazione e la gestione dei corsi di formazione per gli operatori, la presenza di verifiche di apprendimento e le osservazioni dell’effettiva applicazione di quanto appreso durante la normale attività lavorativa.

Tabella 2. Lista di riscontro del rischio biologico infettivo al macello
Table 2. Check-list for the evaluation of Biological Infectious Risk in Pig Slaughter Facilities

1. ANIMALI

INFORMAZIONI DALL’ALLEVAMENTO	☐ SI	☐ NO
SEGNALAZIONI/DENUNCE (nel corso dell’attività di macellazione)	☐ Mal Rosso	
	☐ Nefriti (Leptosirosi)	
	☐ Ascessi (MRSA)	
	☐ Artriti (<i>S. suis</i>)	

2. IMPIANTO DI MACELLAZIONE

N° SUINI MACELLATI	Per anno	
	Per settimana	
	Per giornata	
LAVAGGIO / DISINFEZIONE IMPIANTO A FINE CICLO	☐ SI	☐ NO

3. OPERATORI

N° DI OPERATORI			
DURATA DEI TURNI			
N° TURNI / GIORNO			
CORSI FORMATIVI SUL RISCHIO BIOLOGICO	☐ SI		☐ NO
VERIFICA APPRENDIMENTO	☐ SI		☐ NO
IMPIEGO DPI	Iugulazione	☐ SI	☐ NO
	Scottatura/ Depilazione	☐ SI	☐ NO
	Eviscerazione	☐ SI	☐ NO
	Ablazione della testa	☐ SI	☐ NO
	Preparazione Mezzene	☐ SI	☐ NO
	Sezionamento	☐ SI	☐ NO
VERIFICA PERIODICA IMPIEGO DPI	☐ SI		☐ NO

4. SEGNALAZIONE CASI CLINICI TRA GLI OPERATORI

			NUMERO
Mal Rosso	☐ SI	☐ NO	
Patologie respiratorie	☐ SI	☐ NO	
Patologie enteriche	☐ SI	☐ NO	
Patologie urinarie	☐ SI	☐ NO	
Artriti	☐ SI	☐ NO	
Congiuntivi	☐ SI	☐ NO	
Otiti	☐ SI	☐ NO	

5. ACCERTAMENTI DIAGNOSTICI PREVENTIVI E DI CONTROLLO

CONTROLLI SIEROLOGICI PERIODICI	☐ SI	☐ NO
Mal Rosso	☐ SI	☐ NO
Leptosirosi	☐ SI	☐ NO
Salmonella	☐ SI	☐ NO
Virus dell’epatite E	☐ SI	☐ NO

CONCLUSIONI

Il rischio biologico occupazionale di origine zoonosica nell’ambito zootecnico non gode ancora dell’attenzione che meriterebbe, nonostante l’aumento del numero dei capi allevati e la selezione di animali iper-produttivi ma immunitariamente deboli abbia certamente contribuito ad amplificarlo; quando e dove sono state tenute nella debita considerazione, il miglioramento delle tecnologie di allevamento e l’attenzione crescente nei confronti dell’applicazione delle pratiche mirate alla tutela benessere animale hanno contribuito a un’attività di controllo e riduzione che, tuttavia, non è ancora entrata nella normalità della gestione sanitaria aziendale.

Al contempo, è cresciuta a livello internazionale l’attenzione per le zoonosi emergenti e riemergenti, diverse delle quali riconoscono nel settore suinicolo un ambito di comparsa e diffusione; allo stato delle cose, però, la percezione del problema appare più consolidata a livello culturale che nella pratica lavorativa aziendale e nelle procedure di controllo e prevenzione; la valutazione del rischio biologico occupazionale è dunque oggettivamente carente e i dati sulla reale presenza degli agenti zoonogeni sono disponibili per quanto riguarda i suini, mentre non altrettanto si può dire per gli operatori della filiera suinicola.

Controllo e prevenzione del rischio biologico occupazionale, dovrebbero invece basarsi sull’applicazione di tecniche razionali di allevamento che lo riducano attraverso la garanzia della sanità animale sotto la responsabilità del medico veterinario; per questa via è possibile garantire anche la sicurezza del lavoro, sotto forma di riduzione del rischio espositivo, in un situazione generale di migliore sanità e maggiore redditività d’impresa, destinata a estendersi anche alla salubrità dei prodotti e quindi al consumatore finale.

La massimizzazione dei risultati è infine ottenibile soltanto in un contesto culturale e operativo interdisciplinare, che affianchi e congiunga l’attività del medico del lavoro a quella del veterinario aziendale in una prospettiva di Sanità Pubblica; conoscenze multidisciplinari e scambi di informazioni facilmente reperibili tra i due ambiti si possono evidentemente

ottenere soltanto integrando e accettando il riconoscimento delle reciproche competenze, fin dal percorso formativo dei corsi di studio e specializzazione. In questa prospettiva va inteso il contributo di questa breve nota, destinato comunque ad avere un seguito in termini di applicazione e verifica sperimentale in campo.

BIBLIOGRAFIA

- Adami S., Ciampalini S., Congedo R., Polidori P., La Russa R. (2014) "Check-list istruzioni per l'uso". Manuali SIFO.
- Cavirani S. (2013) Mal Rossino In: "Le patologie del maiale". 1a Ed. PVI Milano, pagg. 509-515.
- Colavita G., Paoletti M. (2007) "Leptospirosi: rischio professionale nella filiera degli alimenti di origine animale". G Ital Med Lav Erg, 29:1, 21-24.
- De Faveri E., Rimoldi S., Pagani C., Sala V. (2014) "Interspecific Epidemiology of MRSA in Pig Farming". J Infect Dis Ther, 2:2-4.
- De Puyseleir L., De Puyseleir K., Braeckman L., Morré S. A., Cox E., Vanrompay D. (2015) "Assessment of Chlamydia suis Infection in Pig Farmers". Trans and Emer Dis. 64 (3): 826-833.
- Di Bartolo I., Martelli F., Inglese N., Pourshaban M., Caprioli A., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2008) "Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy". Vet Microb, 132: 47-55.
- EFSA. (2016) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015". EFSA Journal, 14 (12): 4634-4885.
- Ghinzelli M., Cancellotti F. M. (2000) "La tutela della salute e sicurezza dei lavoratori nel settore agro-zootecnico: il ruolo del veterinario". Professione Veterinaria, 10: 11-18.
- Gusmara C., Sala V. (2007) "Streptococcus suis non è solo un problema suinicolo". SUMMA, 1: 30-33.
- Matassa E. (2007) "Zoonosi e sanità pubblica: un approccio interdisciplinare per un problema emergente". Springer Ed., pagg. 1-30.
- Sala V. Gusmara C. (2008) "Salmonellosi suina in Europa: situazione e prospettive". SUMMA, 7: 20-25.
- Sala V., De Faveri E. (2013) "Rischio zoonosico in suinicoltura e medicina del lavoro". SUMMA, 1: 1-4.
- Sala V., De Faveri E. (2013) "La leptospirosi: paradigma delle zoonosi occupazionali in suinicoltura". SUMMA, 3: 1-6.

DETERMINAZIONE DELL'ETA' DELLE LESIONI CUTANEE PRESENTI SULLA CARCASSA DI SUINO TRAMITE L'UTILIZZO DI UNO SPETTROFOTOMETRO E CONFRONTO CON I DATI OTTENUTI DALLE ANALISI DI ESPRESSIONE GENICA, ISTOLOGIA E ATTIVITA' ENZIMATICA

ASSESSMENT OF THE AGE OF SKIN LESIONS ON PIG CARCASS THROUGH THE USE OF A SPECTROPHOTOMETER AND ITS RELATIONSHIPS WITH GENE EXPRESSION, HISTOLOGY AND ENZYMATIC ACTIVITY PARAMETERS

VITALI M.^{1,*}, CONTE S.^{2,5}, LESSARD M.², DESCHÊNE K.²,
BENOIT-BIANCAMANO M.O.³, CELESTE C.⁴, MARTELLI G.¹, SARDI L.¹,
GUAY F.⁵, FAUCITANO L.²

¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, I-40064 Ozzano dell'Emilia, Italy; ²Agriculture and Agri-Food

Canada, Sherbrooke Research and Development Centre, Sherbrooke, QC J1M 0C8, Canada; ³Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; ⁴Department of Veterinary Biomedicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montréal, Saint-Hyacinthe, QC J2S 2M2, Canada; and ⁵Department of Animal Science, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada.

Key words: analisi colorimetrica, carcassa suina, età delle lesioni cutanee.

Key words: pig carcass, skin lesion age, color assessment.

Riassunto: Le lesioni cutanee presenti sulla carcassa suina sono indice di scarso benessere animale e causa di perdita di valore della carcassa. Distinguere l'età delle lesioni consentirebbe di identificare i fattori di rischio e di prevenirli. Scopo dello studio è stimare l'età delle lesioni cutanee sulla carcassa suina attraverso l'analisi colorimetrica e di confermare i risultati con parametri biologici. 96 suini sono stati mescolati 4 volte nei 3 giorni antecedenti la macellazione e 80 lesioni sono state selezionate e classificate in 4 categorie di età. La cute integra è stata utilizzata come controllo. Dopo il dissanguamento, sono state prelevate 3 biopsie per ogni lesione e controllo per le analisi di espressione genica, istologiche e di attività enzimatica, poi il colore è stato valutato visivamente e strumentalmente mediante uno spettrofotometro. I risultati hanno dimostrato che i valori ΔL^* e Δa^* ottenuti con lo spettrofotometro distinguevano lesioni $<7h$ o $>25h$ di età ($P < 0,05$). L'espressione dei geni *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1* e *SERPINE1* era maggiore ($P < 0,05$) in lesioni $<7h$ di età, mentre *TIMP1* era maggiore ($P < 0,05$) in lesioni $>25h$ di età. L'istologia ha dimostrato che la gravità della risposta infiammatoria era correlata con l'età delle lesioni (minor punteggio in lesioni $<7h$ e maggior punteggio in lesioni $>25h$; $P < 0,05$). Concludendo, lo spettrofotometro potrebbe essere una metodica applicabile al macello per distinguere tra lesioni molto recenti o di almeno un giorno.

Abstract: The presence of lesions on the pig carcass is an indicator of poor animal welfare and downgrades the carcass value. Assessing the age of lesions on the carcass may help to identify risk factors and ultimately to prevent their occurrence. The aim of this study was to assess the age of lesions on pig carcasses through spectrophotometric color evaluation

and to relate the results with biological parameters. 96 barrows were mixed 4 times over 3d before slaughter and 80 lesions were selected to define 4 age categories. Nonlesioned skin was used as a control. At slaughter, 3 biopsies per lesion and control skin were taken immediately after bleeding for analyses of gene expression, histology, and enzyme activity. The number of lesions was counted on each carcass, and the color was assessed visually and instrumentally through a spectrophotometer. Results indicated that the spectrophotometer ΔL^* and Δa^* values variation allowed the identification of <7h or >25h old lesions ($P < 0.05$). The expression of *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1*, and *SERPINE1* genes was higher ($P < 0.05$) in <7h old lesions, while *TIMP1* gene expression was higher ($P < 0.05$) in <25h old lesions. The histology showed that the severity of inflammation was correlated with the age of the lesion (lower score in <7h old lesions and higher score in >25h old lesions; $P < 0.05$). To conclude, the spectrophotometric assessment of lesions appears to be a reliable method to discriminate between fresh and older lesions on the carcass.

INTRODUZIONE

La presenza di lesioni cutanee è un *animal-based criteria* utilizzato per la valutazione del benessere animale (Welfare Quality, 2009), nonché un problema economico in quanto causa di una perdita di valore della carcassa (MLC, 1985) e di un maggiore costo di manodopera (Faucitano, 2001). Cause predisponenti l'insorgenza di lesioni cutanee sono dovute a condizioni e pratiche di allevamento sfavorevoli tra cui il mescolamento degli animali (Faucitano, 2001). Le lesioni vengono correntemente valutate utilizzando delle scale colorimetriche (MLC, 1985) o attraverso la conta del numero e della tipologia di lesione (ITP, 1996; Welfare Quality, 2009). Attualmente non esistono infatti metodi affidabili per stimare l'età delle lesioni nei suini. È noto che l'evento traumatico può avvenire in ogni fase del processo pre-macellazione (Aaslyng et al., 2013), pertanto riuscire a risalire al momento in cui una lesione è stata inflitta potrebbe essere utile per prevenire o ridurre l'occorrenza. Il metodo comunemente utilizzato per valutare l'età delle lesioni al macello è quello visivo (Rocha et al., 2013); tuttavia questo metodo è suscettibile all'errore umano (Scafide, 2012). La determinazione oggettiva dell'età delle lesioni è stata studiata in diverse specie di animali di allevamento (Hamdy et al., 1957; Strappini et al., 2009; Munro and Munro, 2013) e in medicina forense su uomo e modelli animali (Wang et al., 2001; Gallant-Behm and Hart, 2006; Kondo and Ishida, 2010; Barington and Jensen, 2016a; b) attraverso l'analisi del colore utilizzando uno spettrofotometro, con tecniche di biologia molecolare e analisi istologiche e istochimiche. Nonostante vi sia la necessità di una metodologia affidabile in grado di determinare l'età delle lesioni cutanee sulla carcassa di suini al macello (Barington and Jensen, 2013), non esistono ad oggi metodi applicabili alle condizioni del settore suinicolo. L'obiettivo di questo studio è quello di sviluppare un metodo colorimetrico oggettivo, utilizzabile in sede di macellazione, in grado di determinare l'età delle lesioni sulla carcassa di suino e in relazione con i risultati ottenuti da indicatori biologici quali l'espressione genica, l'istologia e l'attività enzimatica.

MATERIALI E METODI

Le procedure sperimentali utilizzate sono state approvate dall'*institutional animal care committee* dell'Agriculture and Agri-Food Canada (AAFC) Sherbrooke Research and Development Centre (Sherbrooke, QC, Canada) secondo quanto previsto dalla vigente normativa del Canadian Council on Animal Care (CCAC, 2009).

Animali e gestione

Un totale di 96 suini castrati (Piètrain x [Large White x Landrace]) sono stati suddivisi in 8

box di 12 suini ciascuno (4 replicati di 2 box ciascuno; $124,2 \pm 1,7$ kg di peso medio). I suini di ogni replicato, sono stati mescolati 3 volte nei 3 giorni prima della macellazione: 2 volte nella porcilaia (2 giorni prima della macellazione e il giorno prima della macellazione) e 1 volta durante il trasporto. Il primo mescolamento consisteva nel raggruppare 6 suini del primo box con 6 del secondo per creare 2 nuovi gruppi di 12 suini ciascuno. Il secondo mescolamento consisteva nel mescolare le restanti metà dei due box iniziali, che non si erano mai incontrate. Nel terzo mescolamento tutti i suini (24) venivano riuniti assieme e rimanevano assieme sino alla macellazione. Le lesioni sono state rilevate 3 h prima e dopo ciascun mescolamento da 2 osservatori addestrati, seguendo le indicazioni presenti nel protocollo Welfare Quality (Welfare Quality, 2009). Contemporaneamente, le lesioni di tutti i suini sono state mappate in entrambi i lati del corpo utilizzando una riproduzione su carta, con un colore diverso per ciascuna osservazione (6 osservazioni in totale, effettuate prima e dopo ogni mescolamento) allo scopo di tenere traccia del momento in cui ciascuna lesione è stata provocata. Le lesioni considerate nello studio erano derivanti da morsicatura o monta, caratterizzate da una forma a virgola o da un lungo graffio rispettivamente, in quanto rappresentative della tipologia di lesioni maggiormente rinvenibili sulle carcasse al macello (Varón-Álvarez et al., 2014). Ciascuna lesione selezionata era costituita da due graffi paralleli di almeno 2,5 cm di lunghezza e 4 mm di spessore. Subito prima della macellazione sono state selezionate 80 lesioni, distribuite nelle 4 categorie di età (20 lesioni/categoria) come segue: T1 (<7 h), T2 (7–25h), T3 (25–30h), e T4 (49–54h). La categoria di ciascuna lesione è stata calcolata in base al tempo intercorso tra la macellazione (T0) e il primo momento in cui la lesione è stata osservata. Le lesioni T1 corrispondevano quindi a lesioni recenti avvenute tra il carico e la macellazione, mentre le altre corrispondevano a lesioni avvenute durante il mescolamento in porcilaia. I suini sono stati tenuti a digiuno nelle 12 h prima della macellazione e poi trasportati in un macello distante 45 min dalla porcilaia. Al macello i suini sono rimasti in attesa per circa 3,5 h (escludendo 1 h di ispezione della cute dopo lo scarico), storditi tramite elettricità e macellati per iugulazione.

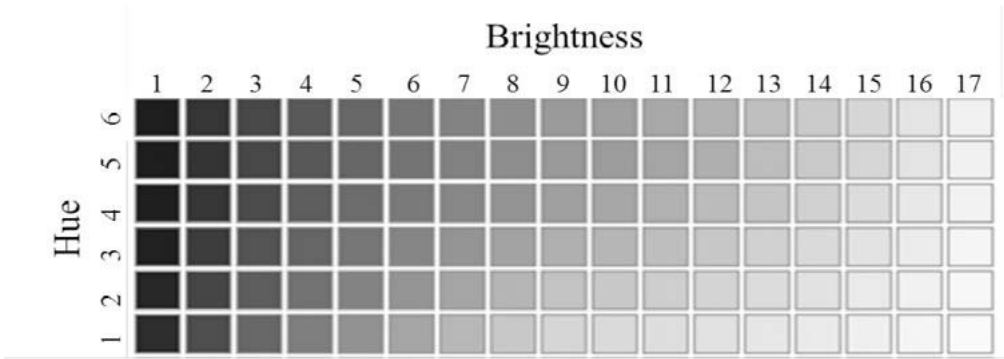
Raccolta dei campioni e misurazioni al macello

Immediatamente dopo il dissanguamento, da ciascun suino sono state prelevate 3 biopsie per ciascuna lesione, campionate in uno dei 2 graffi paralleli di cui ciascuna lesione era composta (80 lesioni in 4 categorie di età = 20 lesioni/categoria) più un controllo per ciascun suino, costituito da cute integra e prelevato nell'area attorno a quella della lesione, utilizzando un *punch* per biopsie di 4 mm (Integra Miltex, York, PA). Un campione per le analisi istologiche è stato immerso in formalina 10% mentre 1 campione per le analisi enzimatiche è stato immerso in un reagente O.C.T. (*optimum cutting temperature*) e successivamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C . Infine il terzo campione è stato immediatamente congelato in azoto liquido e conservato a -80°C in attesa dell'estrazione dell'mRNA e successive analisi di real-time PCR.

Nella cella frigo, il numero di lesioni è stato contato utilizzando una versione riadattata del Welfare Quality protocol for Pigs (Welfare Quality, 2009), escludendo le orecchie dal conteggio in quanto erano state rimosse durante la macellazione. I danneggiamenti della cute causati dai processi di macellazione (es. flambatura) sono stati esclusi dal conteggio. Le carcasse sono state classificate utilizzando una scala da 0 (max 4 lesioni nel corpo intero) a 2 (> 11 lesioni in 2 regioni del corpo o più di 15 lesioni in una regione). Il colore è stato valutato visivamente sulle lesioni e sul controllo utilizzando una scala colorimetrica (Figura 1) e ciascuna lesione è stata fotografata, per una successiva validazione. Il colore è stato poi misurato strumentalmente 3 volte in 3 posizioni diverse lungo ogni lesione (nel secondo graffio, dove non erano presenti le biopsie) così come nell'area di cute non lesa attorno

alla lesione, utilizzando uno spettrofotometro CM700d (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan). Lo strumento è stato settato come segue: 8° viewing angle; 2° observer angle; D65 illuminant; specular component included (SCI); diametro dell'area di misurazione di 3 mm; colore CIE L*a*b*.

Figura 1. Scala colorimetrica utilizzata per la valutazione visiva del colore.



Analisi istologiche e istochimiche

Istologia. Le biopsie sono state tagliate in 2, processate come da routine e immerse in paraffina (TissuePrep 2 Micron; Fisher Scientific, Ottawa, ON, Canada). Le sezioni di 4 µm di spessore sono stati deparaffinizzate e quindi fissate con hematoxylin-eosin-phloxin-saffron (HEPS) per valutare i seguenti 4 parametri su derma e epiderma: infiammazione; erosione/ulcerazione; emorragia e necrosi.

Fosfatasi alcalina (ALPase). I campioni sono stati tagliati in sezioni da 4 µm utilizzando un criostato Leica CM3050S (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada) a -24°C. Per le analisi è stato utilizzato il colorante Alkaline Phosphatase Staining (Red) Kit (Cell Biolabs Inc., San Diego, CA). I vetrini sono stati poi colorati con StemTAG™ AP Staining solution e incubati a temperatura ambiente per 15-30 min, al buio e poi addizionati con 0,1% di Fast Green. La fosfatasi alcalina appariva di colore rosso su di uno sfondo azzurro.

Adenosin trifosfatasi (ATPase). I campioni sono stati tagliati in sezioni di 4 µm nel criostato a -24°C e portati a pH 9,4 secondo il metodo descritto da Bancroft (1975). I vetrini sono stati addizionati con Harris hematoxylin per 25 s e quindi sciacquati con acqua distillata. L'asciugatura è stata fatta come segue: 80% alcool per 2 min; 95% alcool per 2 min; 100% alcool per 2 min e tuluolo per 5 min. I vetrini sono stati caricati utilizzando un Leica CV 5000 automated cover slipper (Leica Biosystems, Concord, ON, Canada).

Analisi microscopica. L'analisi microscopica per l'HEPS e istochimica è stata effettuata utilizzando un microscopio ottico Olympus BX41 (Olympus America Inc., Melville, NY). Una magnificazione di 25 a 400 X è stata utilizzata quando appropriata. Per l'infiammazione, l'emorragia, ATPase epidermica, e ALPase del derma e dell'epidermide la seguente scala è stata utilizzata per descrivere le lesioni: 0= assente; 1=minima; 2= media; 3= moderata; 4=grave. Per l'erosione/ulcerazione e la necrosi dell'epidermide questa scala è stata modificata in base alla superficie dell'epidermide affetta in ciascun campione, come segue: nessun valore = 0% dell'epidermide; 1= <25%; 2= 25-50%; 3= > 50-75%; 4= >75-100%.

Espressione genica

Un campione (30 mg) è stato prelevato a seguito di omogeneizzazione della biopsia con buffer RTL e mercaptoetanolo. L'RNA totale è stato estratto utilizzando il RNA Fibrous Mini Kit (Quiagen, Hamburg, Germany) ed eluto in 30 µl di acqua nucleasi-free. Tutti i campioni sono stati quantificati utilizzando lo spettrofotometro NanoDrop (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). Valori di RIN (RNA integrity number) >8 confermavano che la qualità dell'RNA era adeguata per l'analisi di real-time PCR. La sintesi di cDNA è stata fatta a partire da 1 µg di RNA utilizzando il RT2 First Strand Kit (Qiagen, Hamburg, Germany) per ottenere 20 µl di soluzione di cDNA diluita 1:15 µl in acqua nucleasi-free. La PCR real-time è stata eseguita utilizzando Step One Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Framingham, MA) per valutare il livello di mRNA per i 12 geni elencati nella Tabella 1. Di questi -geni-, 10 erano geni target (CCL2, IL6, ITGA3, SERPINE1, MMP1, TIMP1, TNFα, IL8, IL10, and COX2), precedentemente selezionati in uno studio preliminare a partire da un gruppo di 94 geni analizzati in base alla loro efficienza nella determinazione dell'età delle lesioni (Vitali et al., 2017). I primer sono stati disegnati utilizzando sequenze di mRNA suino per tutti i geni di interesse (Tabella 1). La reazione di amplificazione della RT-PCR iniziava con 10 min di attivazione enzimatica a 95°C, seguita da 40 cicli di 15 s di denaturazione a 95°C e 1 min di annealing e estensione a 60°C. Ogni campione è stato analizzato in triplicato. La quantificazione è stata calcolata per ciascuno dei 10 geni target utilizzando il metodo ²ΔΔCT (Livak and Schmittgen, 2001) utilizzando i geni B2M e HPRT1 come geni housekeeping, e la cute non lesa come controllo.

Tabella1. Primer utilizzati nel presente studio.

Gene	Primer	Diluzione, nM	Sequence number
CCL2	F CTGCACCCAGGTCCTTGCCC	300	NM_214214
	R CTGCTGGTGACTCTTCTGTAG	300	
IL6	F GGAAATGTCGAGGCTGTGCAGATT	300	NM_214399.1
	R GGTGGTGGCTTTGTCTGGATTCTT	300	
COX2	F AAGCGAGGACCAGCTTTCACCAAA	300	NM_214321.1
	R GCGCAGTTTATGCTGTCTCTCCAA	300	
ITGA3	F ATCATTTGCGAGCTGGGGAAC	50	XM_005668880
	R CAGCTGCGCCTGGAGTTC	50	
MMP1	F TGCCAAATGGACTTCAAGCTGC	300	NM_001166229
	R GATCTGTGGATGTCCTTG GGG	300	
TIMP1	F ACCAAGATGTTCAAAGGGTTCAAT	300	NM_213857
	R TCCGCAGACGCTCTCCAT	300	
IL8	F AGAACTGAGAAGCAACAACACAG	300	NM_213867.1
	R CACAGGAATGAGGCATAGATGTAG	300	
TNFα	F CACTGACCACCACCAAGAATTGGA	300	NM_214022.1
	R CATTCCAGATGTCCCAGGTTGCAT	300	
SERPINE1	F CCACCCCCGACGGCCATTAC	300	NM_213910.1
	R TGGTGAGGGCGGAGAGAGGC	300	
IL10	F GATATCAAGGAGCACGTGAAGTC	300	NM_214041.1
	R GAGCTTGCTAAAGGCACTCTTC	300	
B2M	F GGATCAGTATAGCTGCCGCG	300	NM_213978.1
	R TCTGTGATGCCGTTAGTGG	300	
RPS18	F CATGTGGTGTGAGGAAAGCA	300	NM_213940.1
	R TTGGCGAGGATTCTGCATAAT	150	

Analisi visiva del colore. Valori delta (Δ hue e Δ brightness) sono stati calcolati come la differenza di colore tra le lesioni e il controllo. I dati sono stati analizzati con SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), utilizzando il test di Kruskal-Wallis, inserendo le 4 categorie di età nel modello.

Analisi spettrofotometrica del colore. I valori derivanti dalla media di 3 misurazioni di ogni lesione, espressi per parametri L^* , a^* , b^* sono stati calcolati e rapportati con i valori ottenuti sul controllo (cute non lesionata) ottenendo i valori delta (ΔL^* , Δa^* , and Δb^*). I valori delta sono stati analizzati utilizzando la PROC MIXED di SAS includendo la categoria di età della lesione come fattore fisso. Le comparazioni multiple sono state fatte correggendo i dati con il metodo di Tukey. Inoltre, l'accuratezza delle misure spettrofotometriche per la determinazione dell'età delle lesioni è stata valutata come descritto da Parikh et al. (2008). Brevemente, questo metodo consisteva nel comparare la classificazione dell'età delle lesioni ottenute con un dato parametro (es. ΔL^*) con la reale età delle lesioni (basata sull'osservazione diretta della loro comparsa nei suini vivi dopo ciascun mescolamento). I valori di sensibilità, specificità e il valore predittivo positivo (PPV; ovvero la probabilità che una lesione sia realmente recente quando il valore è superiore al valore soglia) sono stati calcolati per selezionare il migliore valore soglia, sopra o sotto il quale una lesione sarebbe stata correttamente classificata come recente o vecchia. Maggiore era la somma di sensibilità, specificità e il PPV, maggiormente accurata era la soglia per la classificazione di età. Il valore predittivo negativo (NPV, ovvero la probabilità che la lesione fosse vecchia quando l'indicatore è sotto il valore soglia) di un indicatore è stato calcolato (Parikh et al., 2008).

Istologia. Per ragioni tecniche, i dati istologici ottenuti da 2 lesioni nella categoria T4 mancavano. Per ridurre il numero di categorie ordinali e aumentare il potere statistico le classi sono state raggruppate come segue: punteggio 0 = classe 0; punteggio 1 = classi 1-2; punteggio 2 = classi 3-4. La relazione tra i punteggi di ciascun parametro e le classi di età sono stati valutati utilizzando il test di associazione Cochran–Mantel–Haenszel per categorie ordinali (*row mean score statistic*). Nel caso di associazione significativa, le comparazioni multiple sono state effettuate correggendo il valore di P con il metodo Bonferroni ($P < 0,008$).

Istochimica dell'attività enzimatica. I valori delta sono stati calcolati come differenza tra i punteggi delle lesioni e quelli del controllo (Δ ATPase, Δ ALPaseE, and Δ ALPaseD). I valori delta sono stati quindi raggruppati come punteggio 0 se il delta era 0, punteggio 1 se il delta era 1 o 2, e punteggio 2 se il delta era 3 o 4. La relazione tra il punteggio di ciascun enzima e le categorie di età delle lesioni sono state valutate tramite il test di Cochran–Mantel–Haenszel per associazioni tra categorie ordinali (*row mean score statistic*).

Espressione genica. Per ragioni tecniche, 1 lesione nella categoria T3 non è stata analizzata. Il valore di *fold change* per ciascun gene espresso e portato a distribuzione normale è stato analizzato utilizzando la PROC MIXED di SAS inserendo la categoria di età come fattore fisso. Le comparazioni multiple sono state fatte utilizzando l'aggiustamento di Tukey–Kramer.

Analisi multivariata. L'analisi fattoriale multivariata per dati misti (FAMD) è stata effettuata utilizzando la procedura PRINCOMP di SAS su variabili selezionate dalle analisi precedenti perché relazionate con l'età delle lesioni, al fine di analizzare le relazioni tra queste variabili e le categorie di età delle lesioni. Le variabili categoriche sono state trasformate in tabelle

separate e incluse nell'analisi PCA insieme alle matrici centrate e scalate delle variabili numeriche. Per tutte le analisi, l'unità sperimentale era la lesione cutanea ($n=80$).

Valori di $P < 0,05$ sono stati scelti come limite per la significatività statistica in tutti i test mentre valori di $P < 0,10$ sono stati considerati come una tendenza.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Punteggio lesioni. In base quanto osservato da Hamdy et al. (1957) il numero di lesioni cutanee può influenzare la velocità di riposta fisiologica nella guarigione delle ferite. In questo studio, tutte le carcasse utilizzate presentavano un punteggio (relativo al numero di lesioni) elevato ($pt = 2$) pertanto questo fattore non ha influenzato i risultati del presente studio, in quanto le carcasse si presentavano omogenee.

Analisi colorimetrica. Nel complesso, l'analisi visiva del colore ha mostrato che le lesioni erano più scure ($-\Delta$ brightness; $P|t| < 0,001$) e più rosse ($-\Delta$ hue; $P|t| < 0,001$) rispetto alla cute integra (Tabella 2). Tuttavia, la determinazione visiva del colore non è stata in grado riconoscere differenze imputabili all'età delle lesioni ($P > 0,10$), confermando l'inaccuratezza di questo metodo nel determinare l'età delle lesioni, in accordo con quanto riportato alcuni studi (Hughes et al., 2004; Barington and Jensen, 2013). La determinazione del colore tramite lo spettrofotometro ha dimostrato che le lesioni erano più scure ($-\Delta L^*$ value; $P|t| < 0,001$), più rosse ($+\Delta a^*$ value; $P|t| < 0,001$) e più gialle ($+\Delta b^*$ value; $P|t| < 0,001$) rispetto alla cute non lesa (Tabella 2). Contrariamente dalla determinazione visiva però, lo spettrofotometro è riuscito ad individuare delle differenze di colore tra le categorie di lesioni. Basandosi sui parametri ΔL^* e Δa^* infatti, le lesioni T1 ($< 7h$) erano più scure e più rosse rispetto alle lesioni T3 ($P = 0,01$ in entrambi i valori colorimetrici) e T4 ($P < 0,001$ and $P = 0,003$ per ΔL^* e Δa^* , rispettivamente); infine è stata osservata una tendenza per i valori ΔL^* e Δa^* tra T1 e T2 ($P = 0,06$ e $P = 0,08$, rispettivamente). Al contrario, l'indicatore del colore giallo (Δb^*) non era diverso tra le categorie di lesioni ($P > 0,10$). Quest'ultimo risultato non è sorprendente, in quanto la componente del giallo, risultante dalla degradazione dell'emoglobina in bilirubina nelle ultime fasi della guarigione (Hughes et al., 2004; Mimasaka et al., 2010) è stata utilizzata come indicatore di lesioni più vecchie di quelle considerate nel presente studio. Infatti, il colore giallo è stato osservato intorno a 72 h in contusioni nell'uomo adulto (Langlois, 2007) o in contusioni di bambini dopo le 3-5 sett (Mimasaka et al., 2010). Nel complesso, la valutazione spettrofotometrica del colore sembra essere un metodo utile per distinguere tra lesioni recenti o vecchie ($< 7h$ vs. $> 25h$) a conferma di quanto osservato in precedenti studi di medicina forense (Hughes and Langlois, 2010; Mimasaka et al., 2010; Grossman et al., 2011).

Nel presente studio, l'efficienza dei parametri ΔL^* o Δa^* , intesi come indicatori dell'età delle lesioni, è stata validata utilizzando un test diagnostico. La migliore soglia utilizzata per il parametro ΔL^* era -15. Quando il valore ΔL^* era più alto della soglia, la lesione veniva considerata $>$ di 7 h. In questo caso, il test diagnostico ha presentato una sensibilità di 0,40, una specificità di 0,95, un PPV di 0,73, un NPV di 0,83. La migliore soglia individuata per Δa^* era 15. Quando il valore di Δa^* era inferiore alla soglia veniva considerato indicatore di lesioni $> 7h$ e il test diagnostico presentava una sensibilità di 0,50, una specificità dell'0,88, un PPV di 0,59 e un NPV di 0,84. Sulla base di questo test, si può concludere che c'era il 73% di possibilità che una lesione fosse vecchia se il ΔL^* era maggiore di -15 e il 59% di possibilità che la lesione fosse vecchia se il Δa^* era minore di 15. In entrambi i parametri considerati, la sensibilità era bassa, pertanto il test è risultato poco sensibile nella distinzione certa tra lesioni recenti e vecchie. Questo è imputabile alla grande variabilità dei dati. Fonti

di variabilità potrebbero essere differenze nella profondità della lesione, la posizione della lesione sulla carcassa e lo spessore del grasso, influenzando così il cambiamento di colore e la velocità del processo di guarigione (Mimasaka et al., 2010). Inoltre anche la variabilità individuale nel processo di degradazione dell'emoglobina nel tempo, dovrebbe essere presa in considerazione (Grossman et al., 2011).

Tabella 1. Effetto dell'età delle lesioni valore delta del colore (colore lesione-colore controllo) valutati visivamente o con l'utilizzo dello spettrofotometro.

Metodo	Categorie di età ¹				se	P-value
	T1	T2	T3	T4		
<i>Visivo</i>						
Δbrightness	-4,50 (-6,50; -3,00)	-4,00 (-5,00; -3,00)	-3,00 (-4,00; -2,50)	-4,00 (-5,00; -3,00)	-	0,34
Δ hue	-1,50 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-1,00 (-2,00; -1,00)	-	0,87
<i>Spettrofotometrico</i>						
ΔL*	-13,16 ^{aA}	-9,05 ^{abB}	-8,22 ^b	-6,63 ^b	1,141	0,001
Δa*	15,11 ^{aA}	10,62 ^{abB}	9,34 ^b	8,43 ^b	1,317	0,003
Δb*	5,85	4,99	5,38	5,04	0,589	0,71

¹Categorie di età: T1= < 7 h; T2= 7-25 h; T3=25-30 h; T4= 49-54 h
^{a-c} *P* < 0,05 ; ^{A-B} *P* < 0,10

Istologia e attività enzimatica. Non è stata trovata nessuna differenza nei punteggi necrosi ed emorragia tra le categorie di lesioni (*P* > 0,10; Tabella 3), mentre il punteggio relativo all'infiammazione ha mostrato una relazione con l'età delle lesioni (*P* <0,001), presentando una maggiore proporzione di lesioni con il punteggio 2, riscontrato nelle lesioni T3 e T4 (> 25 h) nel confronto con T1 (<7h) (*P* = 0,001 e *P* <0,001, rispettivamente). Un risultato simile è stato riportato in ferite in uomini adulti di 33-49 h (Takamiya et al., 2008)e in contusioni cutanee di topi, agnelli e capretti comprese tra 24 e 71 h (McCausland and Dougherty, 1978; Takamiya et al., 2005). Anche il punteggio erosione/ulcerazione ha presentato una tendenza (*P* =0,07) con punteggi più elevati in T3 e T4 a confronto con T1 (Tabella 3). Non è stata trovata nessuna associazione per i parametri ATPase dell'epidermide e ALPase e ATPase nel derma tra le lesioni e il controllo (*P* >0,1, Tabella 3), suggerendo che l'utilizzo dell'istochimica applicata all'attività enzimatica non sia appropriata per la valutazione dell'età delle lesioni cutanee sulla carcassa di suino. Questo potrebbe verosimilmente dipendere da una presenza non costante di ATPase and ALPase nei vetrini, come precedentemente riportato da (Betz, 1994) e (Cecchi, 2010). Anche se non sono presenti molti studi sull'utilizzo di ALPase come indicatore del processo di guarigione delle ferite, questo enzima è stato usato in alcuni studi come indicatore per datare le lesioni cutanee (Abe et al., 2001; Hawkins and Abrahamse, 2007). Una maggiore presenza di ATPase e ALPase è stata riportata in ferite cutanee di uomo di 1h e 4-8 h, rispettivamente, in grado di persistere sino a 16 h (Raekallio, 1972; Dettmeyer, 2011). Psaroudakis et al. (2001) ha riscontrato un'aumentata presenza di ATPase in ferite di coniglio da 2 a 20h dopo la lesione e di ALPase da 3,5 h sino a 32 h dopo la lesione. Le differenze osservate tra gli studi possono essere dovute a vari fattori, tra cui la tipologia di lesione (graffi o ferite) o la struttura della cute, che è specie-specifica.

Tabella 2. Variazione dei punteggi istologici e dei valori delta (lesione-controllo) per l'attività enzimatica, in relazione alle categorie di età delle lesioni.

	N	Categoria di età ²	Punteggio ¹			P-value
			0	1	2	
Istologia						
Necrosi	78	T1	25,00	60,00	15,00	0,16
		T2	10,00	50,00	40,00	
		T3	15,00	55,00	30,00	
		T4	11,11	44,44	44,44	
Erosione/ulcerazione	77	T1	50,00	35,00	15,00	0,07
		T2	15,00	50,00	35,00	
		T3	26,32	42,11	31,58	
		T4	16,67	44,44	38,89	
Infiammazione	78	T1	45,00	55,00	0,00	<0,001
		T2	20,00	50,00	30,00	
		T3	10,00	55,00	35,00	
		T4	5,56	50,00	44,44	
Emorragia	78	T1	15,00	75,00	10,00	0,50
		T2	25,00	65,00	10,00	
		T3	0,00	95,00	5,00	
		T4	11,11	72,22	16,67	
Attività enzimatica						
ΔALPaseE ³	79	T1	50,00	50,00	-	0,16
		T2	84,21	15,79	-	
		T3	60,00	40,00	-	
		T4	60,00	40,00	-	
Δ ALPaseD ⁴	79	T1	40,00	45,00	15,00	0,76
		T2	57,89	21,05	21,05	
		T3	40,00	55,00	5,00	
		T4	35,00	45,00	20,00	
Δ ATPase ⁵		T1	85,00	15,00	-	0,73
		T2	84,21	15,79	-	
		T3	94,74	5,26	-	
		T4	85,00	15,00	-	

I valori rappresentano la percentuale di lesioni in ogni categoria di età in base al punteggio attribuito per ciascuna analisi. Il *P*-value è stato ottenuto con il Cochran-Mantel-Haenszel test (*row mean score*).

¹ Punteggio infiammazione e emorragia: 0 = assente; 1 = minimo -medio; 2 = moderato-severo. Punteggio necrosi/erosione: 0 = 0%; 1 = < 25% - <50%; 2 = 50-100% dell'epidermide. Per gli enzimi: 0 = valore delta di 0; 1 = valore delta 1-2; 2 = valore delta 3- 4.

² Categorie di età: T1 = < 7 h; T2 = 7-25 h; T3 = 25-30 h; T4 = 49-54 h

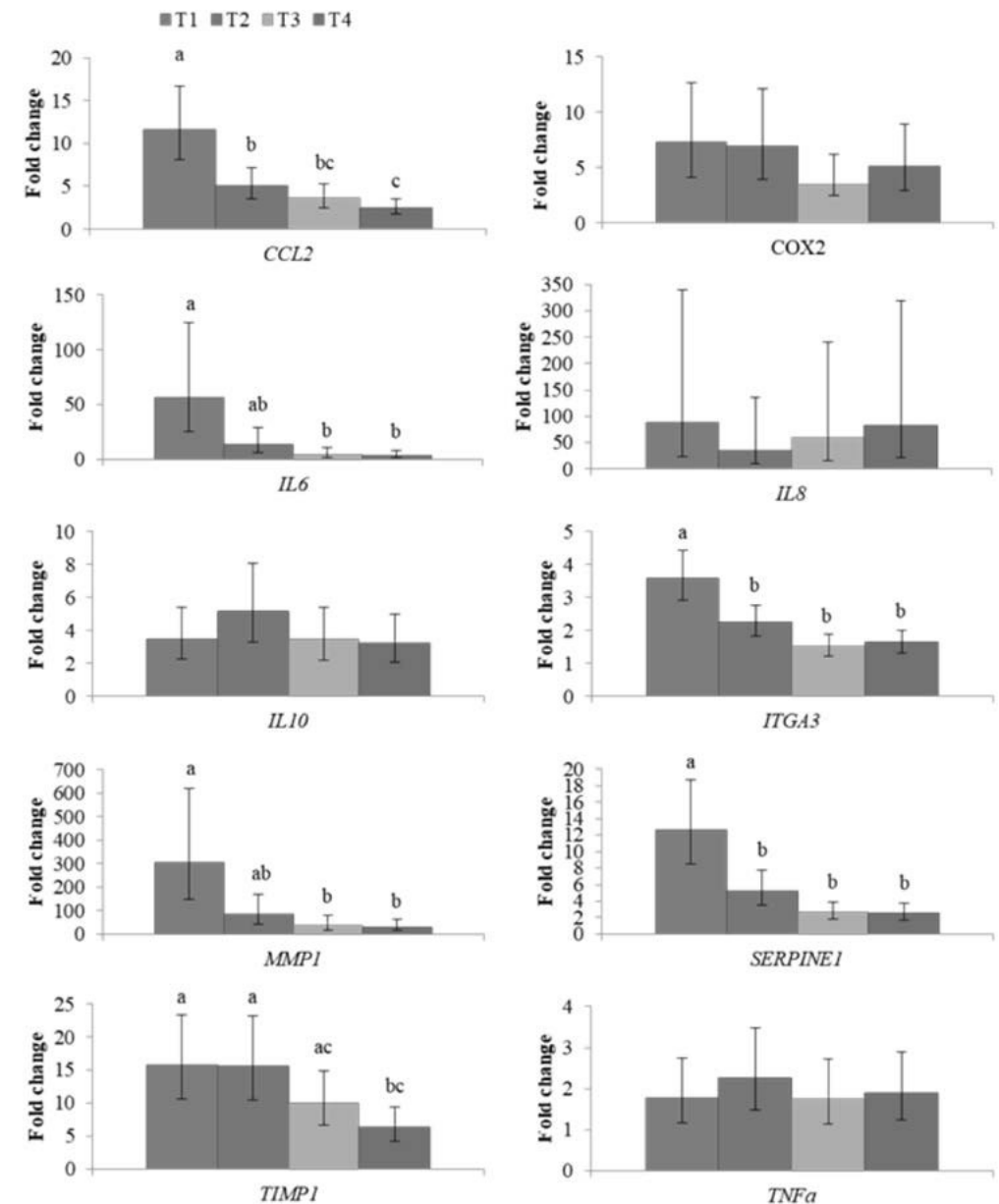
³ ALPaseE= Fosfatasi alcalina nell'epidermide

⁴ ALPaseD= Fosfatasi alcalina nel derma

⁵ ATPase= Adenosin trifosfatasi nell'epidermide

Espressione genica. Dei 10 geni testati, 6 (*CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *SERPINE1*, *MMP1*, e *TIMP1*) hanno mostrato un livello di espressione relazionato all'età delle lesioni, con un valore di *fold change* più elevato nelle lesioni T1 e progressivamente decrescente nelle lesioni più vecchie (categoria di età: $P < 0,05$, Figura 2). Al contrario, gli altri 4 geni (*TNF α* , *IL8*, *IL10* e *COX2*) erano ugualmente sovraespressi, pertanto non vi era una del loro livello di espressione nel tempo ($P > 0,10$). Quando comparate con le lesioni T2, le lesioni T1 presentavano un maggiore *fold change* nei geni *CCL2* ($P = 0,008$), *ITGA3* ($P = 0,01$), e *SERPINE1* ($P = 0,01$). Inoltre, un maggiore ($P < 0,001$) *fold change* è stato osservato nelle lesioni T1 per i geni *CCL2*, *IL6*, *ITGA3*, *MMP1*, e *SERPINE1* se comparati con T3 e T4. Nessuna differenza è stata trovata nell'espressione di questi geni tra le categorie T4 e T3 ($P > 0,10$). Un valore diverso di espressione è stato trovato per il gene *TIMP1* quando comparato con gli altri geni, con un *fold change* più elevato ($P = 0,01$) nelle lesioni T1 e T2 se comparato con T4. Nessuna differenza è stata osservata nell'espressione di questo gene tra T1 e T2 ($P > 0,10$). Fatta eccezione di *CCL2*, *IL6* e *MMP1*, l'espressione dei geni testati in questo studio non è mai stato utilizzato prima per stimare l'età delle lesioni in nessuna specie, inclusi gli umani. *CCL2* è una chemioquina principalmente coinvolta nella risposta infiammatoria, che regola il reclutamento di monociti/macrofagi (Werner and Grose, 2003; Kondo and Ishida, 2010). La maggiore espressione di *CCL2* riscontrata in lesioni recenti (T1) è in accordo con quanto riscontrato in ferite cutanee di topi (Kondo and Ishida, 2010; Wang et al., 2015).

Figura 3. Espressione genica per le quattro categorie di età delle lesioni cutanee. (^{a,b} $P < 0,05$). Le barre di errore rappresentano i valori massimi e minimi del *fold change*. T1= < 7h; T2= 7-25 h; T3=25-30 h; T4= 49-54 h.

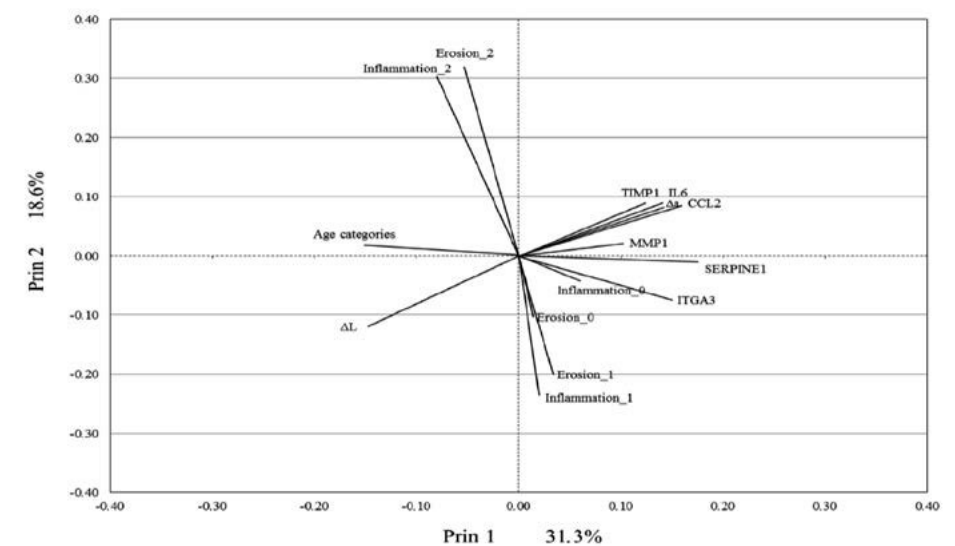


La maggiore espressione di *IL6*, una citochina proinfiammatoria che svolge un ruolo essenziale e precoce nella risposta di guarigione, (Werner and Grose, 2003; Lin et al., 2003), è in accordo con quanto osservato anche da Stato e Oshima (2000) in ferite cutanee di topo. Questi risultati sono in contrasto con quelli di Wang et al. (2015), il quale ha riportato il picco di espressione di questo gene a 1 giorno dalla lesione, in uomini e topi. Infine *MMP1*, coinvolto nelle fasi di infiammazione, processo di degradazione della matrice, di migrazione cellulare (Rohani and Parks, 2015) rimodellamento del tessuto e angiogenesi (Gallant-Behm and Hart, 2006; Wang et al., 2015) è stato il gene maggiormente espresso in questo studio. Madlener et al. (1998) ha riportato un aumento di espressione di questo gene in ferite di topo, ma solo a partire da 1 giorno dopo la lesione. Il presente studio fornisce la prima evidenza che l'espressione di questo gene aumenta in lesioni più recenti (<7h). Studi precedenti riportano che *Itga3* e *Timp1* erano coinvolti nel processo di guarigione delle ferite in topi (Madlener et al., 1998; Reynolds et al., 2008). Un maggiore livello di proteasi della famiglia delle SERPIN è stato inoltre rilevato nell'essudato di ferite negli uomini (Eming et al., 2010). Il nostro studio ha chiaramente mostrato che il livello di espressione di questi geni era diverso in relazione al processo di guarigione nelle ferite cutanee. *SERPINE1* è conosciuto per essere coinvolto nella stimolazione di *MMP* e integrine (Li et al., 2003; Behm et al., 2012) che erano maggiormente espresse in lesioni T1 in questo studio. Inoltre le integrine sono anche coinvolte nell'attivazione di *TIMP*, un inibitore di *MMP* (Li et al., 2003; Behm et al., 2012), e sono risultate le maggiormente espresse in T3 rispetto agli altri geni misurati in questo studio. I geni *TNFα*, *IL8*, *IL10* e *COX2* erano tutti coinvolti nella risposta infiammatoria e regolatori delle altre fasi della guarigione delle ferite (Gilroy et al., 1999; Werner and Grose, 2003; Takamiya et al., 2008; Cecchi, 2010). Studi in suini e topi (Wang et al., 2001, 2015, 2016) riportano una maggiore espressione di *TNFα* in ferite profonde di 1a14 giorni di età. Una simile variazione nell'espressione non è stata vista per *IL10*, nonostante la sua espressione sia stimolata da *TNFα* (Wanidworanun and Strober, 1993). Tuttavia in anche letteratura sono stati osservati risultati molto differenti con picchi a 60 min (Ohshima and Sato, 1998), 3h e 3 giorni dopo la lesione (Sato et al., 1999). L'espressione di *IL8* e *COX2* è stata riportata sino a 4 giorni dopo la lesione in uomini (Engelhardt et al., 1998) e in ferite da incisione da 1 a 3 h in conigli (Bai et al., 2008). Nel presente studio, la mancanza di differenze nell'espressione nelle diverse categorie di età di *TNFα*, *IL8*, *IL10*, e *COX2* e la grande variazione nell'espressione di *IL8* all'interno di categorie di lesioni suggerisce che questi geni non siano adatti come marcatori per la determinazione dell'età delle lesioni. Complessivamente, la valutazione combinata dell'espressione di *MMP1*, *SERPINE1*, *IL6*, and *CCL2* potrebbe essere utile per distinguere tra lesioni recenti e vecchie (<7 h vs 25 h), mentre l'analisi dell'espressione di *TIMP1* potrebbe riuscire a distinguere tra lesioni <25 h e >49 h, nella carcassa di suino. Questi risultati confermano l'efficienza dell'analisi real-time PCR su mRNA per la valutazione dell'età delle lesioni, come riportato in altri studi (Kondo and Ishida, 2010). Tuttavia, nonché molto promettente, questo metodo potrebbe avere alcune limitazioni se applicato alle condizioni commerciali in quanto è complicato, lungo e dispendioso (Takamiya et al., 2008).

Analisi multivariata. Un approccio basato sull'analisi simultanea di molti fattori è considerato il migliore per sviluppare un metodo affidabile nella datazione delle lesioni (Cecchi, 2010). I fattori utilizzati nella FAMD sono stati selezionati dall'analisi dell'espressione genica (*TIMP1*, *IL6*, *CCL2*, *SERPINE1*, *ITGA3* e *MMP1*), dall'analisi spettrofotometrica del colore (Δa^* e ΔL^*), dall'istologia (i.e., inflammation and erosion) tra quelli maggiormente relazionati alle categorie di età delle lesioni. L'analisi multivariata dei parametri selezionati ha mostrato che la varianza nell'età delle lesioni può essere spiegata per il 49,9% dalla combinazione delle componenti Principale 1 (Prin 1) e Principale 2 (Prin 2)

come mostrato in Figura 3, attribuibile al processo di guarigione. L'altro 50,1% della varianza potrebbe essere dovuta ad altri fattori, come la gravità delle lesioni (Barington and Jensen, 2016b), la variabilità di risposta fisiologica individuale, le condizioni corporee dell'animale (es. il peso corporeo e lo spessore del grasso sottocutaneo), nonché la regione anatomica delle lesioni (Cecchi, 2010; Mimasaka et al., 2010; Grossman et al., 2011). La posizione delle variabili rispetto a Prin 1 e Prin 2 nell'immagine (Figura 3), mostra che le categorie di età delle lesioni sono negativamente associate all'espressione genica e al valore Δa^* dello spettrofotometro, indicando che maggiore è l'età delle lesioni, minore è l'espressione genica e il valore di Δa^* . In questo studio, le lesioni recenti erano infatti più rosse e presentavano un maggiore livello di espressione genica. La posizione opposta del vettore riguardante ΔL^* in relazione con il valore Δa^* e con tutti i vettori dell'espressione genica può essere spiegato dal valore negativo di L^* che aumenta mano a mano che il colore della lesione diventa scuro. Il punteggio 0 e 2 nel parametro infiammazione (assenza e moderato-severo, rispettivamente) erano negativamente e positivamente associati, rispettivamente, all'età delle lesioni, indicando che la risposta infiammatoria nel tessuto cutaneo aumenta all'aumentare dell'età delle lesioni. Nessuna relazione è stata trovata tra il punteggio 1 (minimo) e l'età della lesione, il che conferma la mancanza di variazione nella percentuale di lesioni che presentavano un minimo o medio livello di infiammazione nella comparazione tra categorie di lesioni (Tabella 3). Questi risultati suggeriscono che questo livello di infiammazione può essere maggiormente relazionato a fattori, quali la severità delle lesioni o la risposta fisiologica individuale, come precedentemente osservato da Barington and Jensen (2016b) in contusioni in suino. Riassumendo, il risultato dell'analisi multivariata mostra l'associazione positiva tra l'espressione di *TIMP1*, *IL6* e *CCL2* e il valore di Δa^* confermando il potenziale dell'analisi spettrofotometrica nella determinazione dell'età delle lesioni.

Figura 3. Analisi fattoriale per dati misti. I punteggi 0, 1 e 2 nei parametri Erosione e Infiammazione rappresentano ogni categoria di guarigione delle lesioni. Le categorie di età sono modificate come segue: 1= < 7h; 2 = 7-25 h; 3=25-30 h; 4 = 49-54 h. Valori delta (D) indicano la differenza tra le lesioni e i controlli per i parametri colorimetrici L^* (lucentezza) and a^* (rosso).



CONCLUSIONI

La necessità conoscere i punti critici pre-macellazione al fine di implementare il benessere e la sostenibilità del settore delle carni suinicole è di attuale interesse e necessitano di sviluppare metodi in grado di determinare l'età delle lesioni sulle carcasse al macello. In questo studio, in base alla valutazione pre-macellazione delle lesioni cutanee, la determinazione dell'età delle lesioni rinvenute sulla carcassa sembra essere una tecnica pratica, veloce e affidabile per distinguere tra lesioni recenti (<7 h) verificatesi tra il trasporto e la macellazione, o più vecchie (>25 h) imputabili all'allevamento. Tuttavia, la grande variabilità nei risultati colorimetrici, probabilmente derivante da variazioni individuali nella composizione corporea (*i.e.* spessore del grasso sottocutaneo), non hanno consentito, in questo studio, di sviluppare un test diagnostico in grado di distinguere accuratamente le classi di età delle lesioni. Ulteriori ricerche sono necessarie per valutare l'impatto dei fattori di variabilità sulla misurazione spettrofotometrica del colore. L'analisi dell'espressione dei geni *MMP1*, *SERPINE1*, *IL6*, *ITGA3*, *TIMP1* e *CCL2* e la risposta infiammatoria nelle lesioni cutanee valutate al macello hanno supportato i risultati ottenuti con lo spettrofotometro. Questa relazione mostra il potenziale di queste tecniche per la validazione di metodi automatici oggettivi per la determinazione dell'età delle lesioni e l'utilità di questo tipo di analisi anche per scopi che vedono il suino come modello sperimentale per studi in medicina umana o forensi.

BIBLIOGRAFIA

- Aaslyng M.D., Brandt P. and Blaabjerg L. (2013) "Assessment and Incidence of Skin Damage in Slaughter Pigs." pp. 18–21. Proceedings of the 59th Intern. Congr. Meat Sci. Technol., Izmir, Turkey.
- Abe T., Abe Y., Aida Y., Hara Y. and Maeda K. (2001) "Extracellular matrix regulates induction of alkaline phosphatase expression by ascorbic acid in human fibroblasts." *J. Cell. Physiol.* 189, 144–151.
- Bai R., Wan L. and Shi M. (2008) "The time-dependent expressions of IL-1 β , COX-2, MCP-1 mRNA in skin wounds of rabbits." *Forensic Sci. Int.* 175, 193–197.
- Bancroft JD 1975. Histochemical techniques. Butterworths, London.
- Barington K. and Jensen H.E. (2013) "Forensic cases of bruises in pigs." *Vet. Rec.* 173, 526.
- Barington K. and Jensen H.E. (2016a) "A novel, comprehensive, and reproducible porcine model for determining the timing of bruises in forensic pathology." *Forensic Sci. Med. Pathol.* 12, 58–67.
- Barington K. and Jensen H.E. (2016b) "The impact of force on the timing of bruises evaluated in a porcine model." *J. Forensic Leg. Med.* 40, 61–66.
- Behm B., Babilas P., Landthaler M. and Schreml S. (2012) "Cytokines, chemokines and growth factors in wound healing." *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 26, 812–820.
- Betz P. (1994) "Histological and enzyme histochemical parameters for the age estimation of human skin wounds." *Int. J. Legal Med.* 107, 60–68.
- Cecchi R. (2010) "Estimating wound age: looking into the future." *Int. J. Legal Med.* 124, 523–536.
- Dettmeyer R.B. (2011) *Forensic Histopathology: Fundamentals and perspectives*. Springer. Berlin, p. 191–209.
- Eming S.A., Koch M., Krieger A., Brachvogel B., Kreft S., Bruckner-Tuderman L., Krieg T., Shannon J.D. and Fox J.W. (2010). "Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds." *J. Proteome Res.* 9, 4758–4766.
- Engelhardt E., Toksoy A., Goebeler M., Debus S., Bröcker E.-B. and Gillitzer R. (1998)

- "Chemokines IL-8, GRO α , MCP-1, IP-10, and Mig Are Sequentially and Differentially Expressed During Phase-Specific Infiltration of Leukocyte Subsets in Human Wound Healing." *Am. J. Pathol.* 153, 1849–1860.
- Faucitano L. (2001). "Causes of skin damage to pig carcasses." *Can. J. Anim. Sci.* 81, 39–45.
- Gallant-Behm C.L. and Hart D.A. (2006) "Genetic analysis of skin wound healing and scarring in a porcine model." *Wound Repair and Regen.* 14, 46–54.
- Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willis D., Chivers J., Paul-Clark M.J. and Willoughby D. (1999) "Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties." *Nat. Med.* 5, 698–701.
- Grossman S.E., Johnston A., Vanezis P. and Perrett D. (2011) "Can we assess the age of bruises? An attempt to develop an objective technique." *Med. Sci. Law.* 51, 170–176.
- Hamdy M.K., Kunkle L.E. and Deatherage F.E. (1957) "Bruised Tissue. II. Determination of the Age of a Bruise." *J. Anim. Sci.* 16, 490.
- Hawkins D. and Abrahamse H. (2007) "How should an increase in alkaline phosphatase activity be interpreted?" *Laser Chem.* 2007, 1–10.
- Hughes V.K., Ellis P.S. and Langlois N.E.I. (2004) "The perception of yellow in bruises." *J. Clin. Forensic Med.* 57, 355–359.
- Hughes V.K. and Langlois N.E.I. (2010) "Use of reflectance spectrophotometry and colorimetry in a general linear model for the determination of the age of bruises." *Forensic Sci. Med. Pathol.* 6, 275–281.
- ITP (1996). "Notation des hématomes sur couenne-porcs vivant ou carcasse." *Institute Technique du Porc*, Rennes, France.
- Kondo T. and Ishida Y. (2010) "Molecular pathology of wound healing." *Forensic Sci. Int.* 203, 93–98.
- Langlois N.E. (2007) "The science behind the quest to determine the age of bruises-a review of the English language literature." *Forensic Sci. Med. Pathol.* 3, 241–251.
- Li W.-Y., Chong S.S.N., Huang E.Y. and Tuan T.-L. (2003) "Plasminogen activator/plasmin system: A major player in wound healing?" *Wound Repair Regen.* 11, 239–247.
- Lin Z.-Q., Kondo T., Ishida Y., Takayasu T. and Mukaida N. (2003) "Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice." *J. Leuk. Biol.* 73, 713–21.
- Livak K.J. and Schmittgen T.D. (2001) "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Meth.* 25, 402–408.
- Madlener M., Parks W.C. and Werner S. (1998) "Matrix metalloproteinases (MMPs) and their physiological inhibitors (TIMPs) are differentially expressed during excisional skin wound repair." *Exp. Cell Res.* 242, 201–210.
- McCausland I.P. and Dougherty R. (1978). "Histological ageing of bruises in lambs and calves." *Aust. Vet. J.* 54, 525–527.
- Mimasaka S., Ohtani M., Kuroda N. and Tsunenari S. (2010) "Evaluating the age of bruises in children spectrophotometric evaluation of the age of bruises in children: Measuring changes in bruise color as an indicator of child physical abuse" *Tohoku J. Exp. Med.* Tohoku J. Exp. Med 220, 171–175.
- MLC (1985) "Concern at rindside damage in pigs." *Meat and marketing tech. Notes* no. 4, Milton Keynes, Meat and Livestock Commission, Bletchley, UK, p. 14–16.
- Munro R. and Munro H.M.C. (2013) "Some challenges in forensic veterinary pathology: A review." *J. Comp. Path.* 149, 57–73.
- Ohshima T. and Sato Y. (1998) "Time-dependent expression of interleukin-10 (IL-10) mRNA during the early phase of skin wound healing as a possible indicator of wound vitality." *Int. J. Legal Med.* 111, 251–255.

Parikh R., Mathai A., Parikh S., Chandra Sekhar G. and Thomas R. (2008) "Understanding and using sensitivity, specificity and predictive values." *Indian J. Ophthalmol.* 56, 45–50.

Psaroudakis K., Tzatzarakis M.N., Tsatsakis A.M. and Michalodimitrakakis M.N. (2001) "The application of histochemical methods to the age evaluation of skin wounds: Experimental study in rabbits." *Am. J. Forensic Med. Path.* 22, 341–345.

Raekallio J. (1972) "Determination of the age of wounds by histochemical and biochemical methods." *Forensic Sci.* 1, 3-16.

Reynolds L.E., Conti F.J., Silva R., Robinson S.D., Iyer V., Rudling R., Cross B., Nye E., Hart I.R., Dipersio C.M. and Hodivala-Dilke K.M. (2008) "alpha3beta1 integrin-controlled Smad7 regulates reepithelialization during wound healing in mice." *J. Clin. Invest.* 118, 965–74.

Rocha L.M., Bridi A.M., Mormède P., Weschenfelder A.V., Devillers N., Bertoloni W., Faucitano L. (2013) "Effect of ractophamine administration and castration method on the response to pre-slaughter stress and carcass and meat quality in pigs of two Pietrain genotypes." *J. Anim. Sci.* 91, 3965-3977.

Rohani M.G. and Parks W.C. (2015) "Matrix remodeling by MMPs during wound repair." *Matrix Biol.* 44–46, 113–121.

Sato Y., Ohshima T. and Kondo T. (1999) "Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265, 194–199.

Stato Y., Ohshima T. (2000) "The expression of mRNA of proinflammatory cytokines during skin wound healing in mice: A preliminary study for forensic wound age estimation (II)." *Int. J. Legal Med.* 113, 140-145.

Scafide K.R.N. (2012) "Determining the relationship between skin color, sex, and subcutaneous fat and the change in bruise color over time." . PhD Thesis. The John Hopkins Univ. , Baltimore, MD.

Strappini A.C., Metz J.H.M., Gallo C.B. and Kemp B. (2009) "Origin and assessment of bruises in beef cattle at slaughter." *Animal* 3, 728–736.

Takamiya M., Fujita S., Saigusa K. and Aoki Y. (2008) "Simultaneous detection of eight cytokines in human dermal wounds with a multiplex bead-based immunoassay for wound age estimation." *Int. J. Legal Med.* 119, 16-21.

Takamiya M., Saigusa K., Kumagai R., Nakayashiki N. and Aoki Y. (2005) "Studies on mRNA expression of tissue-type plasminogen activator in bruises for wound age estimation". *Int. J. Legal Med.* 122, 143-148.

Varón-Álvarez L., Romero M. and Sánchez J. (2014) "Caracterización de las contusiones cutáneas e identificación de factores de riesgo durante el manejo presacrificio de cerdos comerciales." *Arc. Med. Vet.* 46, 93–101.

Vitali M., Conte S., Martelli G., Lessard M. and Faucitano L. (2017) "Which genes are the best indicators for lesion age determination on the pig carcass? A preliminary study. In: Proc. 7th Int. Conf. on the Assessment of Welfare at Farm and Group Level (WAFL), Sept 5-8, Wageningen, The Netherlands.

Wang J.F., Olson M.E., Reno C.R., Wright J.B. and Hart D.A. (2001) "The pig as a model for excisional skin wound healing: characterization of the molecular and cellular biology, and bacteriology of the healing process." *Comp. Med.* 51, 341–348.

Wang Y., Yamamoto Y., Kuninaka Y., Kondo T. and Furukawa F. (2015) "Forensic Potential of MMPs and CC Chemokines for Wound Age Determination." *J. Forensic Sci.* 60, 1511–1515.

Wang L.L., Zhao R., Liu C.S., Liu M., Li S.S., Li J.Y., Jiang S.K., Zhang M., Tian Z.L., Wang M., Zhang M.Z. and Guan D.W. (2016) "A fundamental study on the dynamics of

multiple biomarkers in mouse excisional wounds for wound age estimation." *J. Forensic Leg. Med.* 39, 138–146.

Wanidworanun C. and Strober W. (1993) "Predominant role of tumor necrosis factor-alpha in human monocyte IL-10 synthesis." *J. Immunol. (Baltimore, Md. : 1950)* 151, 6853–61.

Welfare Quality (2009) "Welfare Quality® Assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs." Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands. 1–123.

Werner S. and Grose R. (2003) "Regulation of wound healing by growth factors and cytokines." *Physiol. Rev.* 83, 835–870.

**PREMIO
GIOVANE LAUREATO 2018**

**VALUTAZIONE DEI FATTORI PREDISPONENTI E STUDIO
MORFOLOGICO E ISTOPATOLOGICO DELLE LESIONI
POLMONARI IN SOGGETTI INFETTI DA *MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE* VACCINATI E NON VACCINATI**

***EVALUATION OF PREDISPOSING FACTORS AND A
MORPHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY
OF PULMONARY CHANGES IN VACCINATED AND
UNVACCINATED NATURALLY MYCOPLASMA
HYOPNEUMONIAE-INFECTED PIGS***

PARISI F., GIULIOTTI L. , BENVENUTI M. N., ROCCHIGIANI G., SALVADORI C.,
POLI A.

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Italy

Parole Chiave: fattori predisponenti, *Mycoplasma hyopneumoniae*, risposta immunitaria polmonare

Key words: local immune response, *Mycoplasma hyopneumoniae*, risk factors.

Riassunto: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*) e numerosi fattori predisponenti sono coinvolti nella patogenesi della polmonite enzootica (PEN). Lo scopo di questo studio è stato quello di studiare la correlazione tra i fattori relativi al management delle aziende e le lesioni polmonari associate alla PEN in suini macellati. Sono stati esaminati macroscopicamente millecentotré polmoni di suino di 18 lotti diversi provenienti da allevamenti italiani. Sono stati raccolti i dati relativi al sistema di produzione, alle pratiche di gestione e ai protocolli di vaccinazione. Centodieci campioni di tessuto polmonare sono poi stati fissati in formalina e sali di zinco per gli studi istopatologici e immunoistochimici, al fine di rilevare gli antigeni *Mh*, i linfociti B e T e i macrofagi. Il nostro studio ha rivelato che il ciclo aperto, un peso di messa a terra inferiore a 30 kg, la presenza di pavimenti fessurati e di ventilazione mista nello stesso allevamento sono importanti fattori predisponenti. Studi macroscopici e istopatologici hanno dimostrato come i soggetti vaccinati presentino lesioni polmonari meno gravi. Nei suini vaccinati senza lesioni polmonari è stato rilevato un aumento dei linfociti B nel BALT e nei setti inter-alveolari. I suini vaccinati con alterazioni polmonari hanno invece presentato una diminuzione dei linfociti B nel BALT, nella parete bronchiolare e nei setti inter-alveolari, un aumento del numero di linfociti T nei setti inter-alveolari e dei macrofagi nel BALT, nella parete bronchiolare e nei setti inter-alveolari. Il nostro studio ha evidenziato i principali fattori di rischio coinvolti nella patogenesi della PEN. Una risposta immunitaria tissutale di tipo umorale è risultata evidente in suini vaccinati senza lesioni polmonari, mentre gli animali vaccinati con polmonite hanno mostrato una riduzione dei linfociti B e una maggiore risposta di tipo cellulo mediata.

Abstract: *Mycoplasma hyopneumoniae* (*Mh*) and several predisposing factors are involved in the pathogenesis of enzootic pneumonia (PEN). The aim of this study was to investigate the correlation between farm management factors and PEN associated pulmonary lesions in slaughtered pigs. One thousand one hundred and three lungs of fattened pigs from 18 different vaccinated and unvaccinated batches from Italian swine farms were macroscopically examined. Data related to production system, management practices

and vaccination protocols were collected. One hundred and ten lung tissue samples were formalin and zinc salts fixed for histopathological and immunohistochemistry studies to detect *Mh*, B- and T-lymphocytes, and macrophages antigens. Our study revealed that open cycle, growing-finishing weight lower than 30 kg, presence of slatted systems and mixed natural and forced ventilation systems are important predisposing factors. Macroscopic and histopathologic studies demonstrated that vaccinated subjects have less severe lung lesions. In vaccinated pigs without pulmonary lesions and increase in B-lymphocytes was detected in BALT and inter-alveolar septa. Vaccinated pigs with PEN lung alterations had a decrease of B-lymphocytes in BALT, bronchiolar wall and inter-alveolar septa and an increased number of T-lymphocytes in inter-alveolar septa and macrophages in BALT, bronchiolar wall and inter-alveolar septa. Our study evidenced the main risk factors involved in the pathogenesis of PEN. A positive humoral tissue immune response was evident in vaccinated pigs without lung lesions. while vaccinated animals with pneumonia showed a reduction of B-lymphocytes and an increased Th1 response.

INTRODUZIONE

La polmonite enzootica (PEN) è una malattia multifattoriale economicamente rilevante nell'allevamento suino dovuta a *Mycoplasma hyopneumoniae*, caratterizzata da bassa mortalità e morbilità molto elevata. La malattia è diffusa in tutto il mondo e la prevalenza stimata in Italia è del 59,9% (Ostanello et al., 2006). Si sospetta che diversi fattori predisponenti, tra cui ciclo di produzione, densità dei capi, condizioni climatiche e strutturali, prevenzione di altre malattie respiratorie e altri fattori che influenzano l'immunità della mandria (Stark, 2000; Maes et al., 2008) siano alla base dell'insorgenza della PEN tuttavia, al giorno d'oggi, il loro potenziale di influenzare questa patologia non è stato ancora pienamente chiarito. Diversi prodotti batterici in corso di infezione da *Mh* sono stati descritti come responsabili dell'alterazione della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata che partecipa alla genesi delle lesioni descritte durante questa infezione, ma finora non sono stati condotti studi approfonditi su soggetti naturalmente infetti da *Mh*. Lo scopo di questo studio è stato quello di indagare la correlazione tra fattori predisponenti, l'insorgenza e la gravità delle lesioni polmonari e le variazioni della risposta immunitaria a livello polmonare nei suini vaccinati e non vaccinati naturalmente infetti da *Mh*.

MATERIALI E METODI

Scelta dei campioni

Utilizzando il metodo descritto da Madec e Kobish (1982) sono stati esaminati 1103 polmoni provenienti da suini pesanti macellati tra gennaio 2016 a gennaio 2017. I soggetti provenivano da 18 allevamenti di suini del Centro e Nord Italia. Ogni lotto esaminato contava 135-136 maiali e tra questi sono stati esaminati macroscopicamente una media di 70 polmoni scelti a caso. Dal 10% dei polmoni esaminati sono stati prelevati dei campioni e trattati per studi istopatologici e immunoistochimici. I criteri di selezione si sono basati sull'assenza di alterazioni macroscopiche correlate ad altre infezioni batteriche.

Analisi macroscopica

Inizialmente i polmoni dei suini macellati sono stati valutati macroscopicamente per indagare la presenza di lesioni correlabili all'infezione di *Mh*. È stato assegnato uno *score* lobare da 0 a 4 a ciascun lobo polmonare seguendo lo schema proposto da Madec

e Kobish, (1982):

Punteggio 0: assenza di lesioni visibili;

Punteggio 1: lesione superficiale inferiore al 25% del lobo;

Punteggio 2: alterazione diffusa fino al 50% del lobo;

Punteggio 3: alterazione estesa fino al 75% del lobo;

Punteggio 4: oltre il 75% del lobo colpito da polmonite.

Tale punteggio è stato registrato per ciascuno dei lobi polmonari dei polmoni esaminati, ad eccezione di quello azigos e, successivamente, i vari punteggi sono stati sommati per raggiungere un punteggio polmonare totale compreso tra 0 e 24. Seguendo un procedimento simile a quello mostrato nello studio di Ostanello et al. (2006), è stato selezionato un punteggio polmonare totale pari a 4 quale *cut off* per discriminare i polmoni sani o con lievi segni di polmonite da quelli colpiti da PEN. La valutazione del punteggio delle lesioni polmonari è stata eseguita da un singolo investigatore (FP).

Attraverso un questionario sono stati raccolti i dati provenienti da tutti i lotti campionati inerenti la gestione dell'azienda e la vaccinazioni. Più in dettaglio, nei vari allevamenti sono stati indagati: tipologia di ciclo, numero di soggetti, densità di allevamento, tipo di razza / ibrido, acquisto di riproduttori, peso vivo finale, peso di messa a terra, età di messa a terra, peso all'ingrasso, età di ingrasso, tutto pieno/ tutto vuoto, ventilazione, pavimentazione, segni clinici di PEN, utilizzo di mangime medicato dopo lo svezzamento, farmaci strategici allo svezzamento e vaccinazione contro il virus della malattia di Aujeszky, influenza, leptospirosi, *Parvovirus*, *Erisipelotrix rhusiopathiae*, *Mh*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e rinite atrofica.

Istopatologia

I campioni di tessuto polmonare prelevati al macello sono stati fissati in formalina tamponata e sali di zinco, processati con metodi istologici di routine, inclusi in paraffina e tagliati a 4 µm di spessore.

Per l'analisi istologica le sezioni dei campioni fissati in formalina sono state colorate con ematossilina ed eosina (E-E). Le alterazioni istopatologiche tipiche della PEN (perdita di ciglia con essudato bronchiolare ed alveolare, iperplasia del BALT e cellularità infiammatoria interstiziale) sono state quantificate in otto campi / sezione ad alto ingrandimento microscopico, seguendo i criteri quantitativi di Hillen et al. (2014):

Punteggio 0 - assenza di alterazione istologica;

Punteggio 1 – lievi modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie;

Punteggio 2 – moderate modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie;

Punteggio 3 – gravi modificazioni tissutali e presenza di cellule infiammatorie.

I punteggi microscopici totali sono stati quindi raggruppati in punteggi bassi (0-1) e alti (2-3) e correlati alla presenza di vaccinazione contro *Mh*.

Immunoistochimica

L'immunoistochimica per la localizzazione dell'antigene *Mh* e delle popolazioni di cellule immunitarie è stata eseguita su sezioni di tessuto fissate in sali di zinco e successivamente incluse in paraffina. Sezioni dello spessore di 4 µm sono state sparaffinate in xilene, idratati attraverso una serie graduata di etanolo e reidratati in acqua bidistillata. Il recupero dell'antigene è stato eseguito a caldo con tampone citrato pH 6.0 per gli anticorpi primari contro l'antigene *Mh*, CD3 e Iba-1 e con tampone tris EDTA pH 8 per l'anticorpo primario. Le sezioni sono state quindi raffreddate a temperatura ambiente per 20 minuti. Dopo il lavaggio in soluzione salina tamponata Tween Tris allo 0,05% (TBST) a pH 7,6, l'attività della perossidasi endogena è stata

bloccata incubando le sezioni con la Peroxidase block solution®, (Dako, Glostrup, Denmark) per dieci minuti a temperatura ambiente e dopo sono stati eseguiti due lavaggi in TBST. Le reazioni aspecifiche sono state bloccate incubando ciascuna sezione con due gocce di Ultra V-block®, (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) per 5 minuti e successivamente gli anticorpi primari sono stati incubati in camere umide per un'ora a temperatura ambiente. Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari: un anticorpo policlonale di topo anti-antigeni *Mh* (p46, MHJ_0511, MyBiosource, san Diego, CA, USA), un anticorpo monoclonale anti-CD3 umano (1: 100, clone F7.2.38, Dako, UK Ltd., Ely, Regno Unito), un anticorpo monoclonale anti-CD79a (1:50, clone HM57, Dak) e un anticorpo policlonale di coniglio anti Iba-1 (1: 300, Wako, Neuss, Germania). Dopo due lavaggi con TBST, questa fase è stata seguita da incubazione con IgG polivalente di capra biotinilato (Thermo Scientific) per 10 minuti. Dopo il lavaggio con TBST, il complesso streptavidina-perossidasi (Thermo Scientific) è stato messo a incubare per 30 minuti. L'attività della perossidasi è stata rivelata mediante incubazione per 10 minuti con 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (ImmPACT DAB Peroxidase Substrate KIT®, Vector Labs inc., Burlingame, CA) e bloccata con acqua bidistillata. Infine, le sezioni sono state colorate con l'ematossilina di Mayer, disidratate e coperte con vetrini coprioggetto.

Analisi morfometrica e statistica

Le cellule marcate da ciascun anticorpo sono state contate in 10 campi selezionati (ingrandimento 40x) nelle seguenti aree: BALT, parete bronchiolare ed essudato nel lume, setti alveolari ed essudato. I risultati dell'analisi morfometrica sono stati espressi come media + deviazione standard (DS) di cellule positive / 1000 µm². I dati relativi alla gestione e alle vaccinazioni degli allevamenti sono stati messi in correlazione con la comparsa e la gravità della PEN mediante una regressione multipla semplificata "stepwise regression". I campi inclusi nell'analisi statistica hanno mostrato una percentuale di risposta di almeno il 75% una certa variabilità tra le risposte. Densità dei capi, ricorso al tutto pieno / tutto vuoto e vaccinazione contro il virus della malattia di Aujeszky, *Parvovirus*, *Actinobacillus Pleuropneumoniae*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, rinite atrofica sono stati omessi seguendo i criteri precedenti in quanto non presentavano variabilità tra le risposte. Sono state eseguite due regressioni stepwise: la prima includendo tutti i dati presi in considerazione, la seconda sui dati risultanti a seguito di un'analisi di varianza e un odds ratio e scegliendo una probabilità di ingresso (PE_n) di 0,250 e una probabilità di uscita (PE_x). Un test del chi quadrato è stato inoltre eseguito per mettere in correlazione il punteggio istologico con la vaccinazione. L'importanza della differenza tra soggetti vaccinati e non vaccinati è stata valutata con l'analisi della varianza utilizzando il pacchetto statistico SPSS Advanced Statistics 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). La significatività statistica è stata basata su un livello di significatività del 5% (P< 0.05).

Risultati

I polmoni affetti da PEN sono caratterizzati da polmonite catarrale nelle parti ventrale dei lobi cranici e medi e, quando la patologia è più grave, nella parte craniale del lobo caudale. Nella parte cranio-ventrale dei polmoni sono presenti aree di consolidamento di colore rosso scuro (acuto) a grigio (cronico), talvolta associate ad atelettasia o enfisema. I reperti tipici dello stato cronico sono le cosiddette "fessures", tessuto cicatriziale che solca il parenchima. Dei 1103 polmoni esaminati, l'83,5% ha mostrato un punteggio polmonare inferiore a 4,

mentre il 16,5% superiore rispetto al *cut-off*. Il punteggio più alto osservato è stato pari a 15 ed è stato riscontrato due volte in polmoni provenienti da allevamenti non vaccinati. Punteggi polmonari inferiori a 4 sono stati associati alla vaccinazione contro *Mh* (19,0% vs 81,0%; p <0,01). I dati sulle aziende esaminate sono riepilogati nella tabella 1.

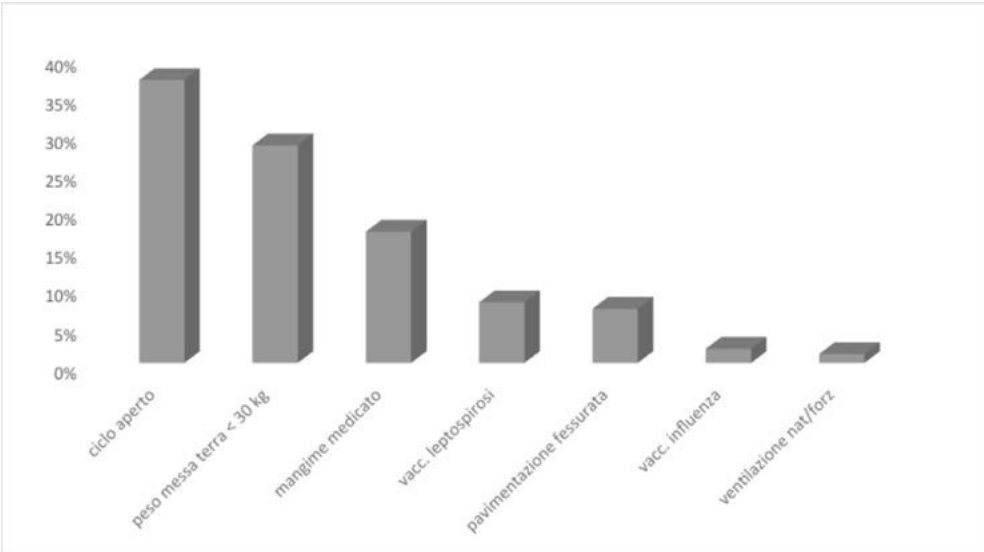
Tabella 1. Caratteristiche degli allevamenti esaminati
Table 1. Characteristic of examined swine farms

Azienda	Tipologia	Peso di messa a terra (kg)	Ventilazione	Pavimentazione	Uso di mangime medicato	Segni clinici di PEN	Vaccinazione per <i>Mh</i>
1	O	>30	N	S&S	YES	YES	YES
2	C	≤30	N&F	S	YES	NO	YES
3	O	>30	N&F	S&S	NO	NO	NO
4	O	>30	N&F	S	YES	YES	YES
5	O	<30	N&F	S	YES	YES	NO
6	O	<30	N&F	S	YES	YES	NO
7	C	<30	N&F	S	YES	NO	YES
8	C	<30	F	S	YES	NO	YES
9	O	≤30	N	S	NO	NO	NO
10	O	>30	N&F	S&S	YES	NO	NO
11	C	≤30	N	S&S	NO	YES	YES
12	C	≤30	N&F	S	YES	NO	YES
13	O	>30	N	S	YES	NO	YES
14	O	>30	N	S	YES	NO	NO
15	C	≤30	F	S	NO	YES	NO
16	C	<30	F	S	YES	YES	NO
17	C	>30	N	S	YES	NO	NO
18	C	≤30	N&F	S	YES	YES	NO

Note: Ciclo: O= Aperto, C= Chiuso; Ventilazione: N= Naturale, F= Forzata, N&F=Naturale e forzata; Pavimento: S=Fessurato; S&S= Fessurato e solido.
Note: Cycle: O= Open, C= Closed; Ventilation: N=Natural, F=Forced, N&F=Natural and forced; Floor: S=Slatted, S&S= Slatted and solid.

Il sistema di produzioni si è basato sul ciclo aperto in nove aziende e sul ciclo chiuso nelle restanti. La maggior parte degli allevamenti ha iniziato il finissaggio quando i suini pesavano meno di 30 kg (11 vs 8). La ventilazione era mista in metà dei lotti campionati, mentre i restanti hanno adottato solamente quella naturale o forzata. La pavimentazione è risultata fessurata e il mangime medicato veniva somministrato nella maggior parte degli allevamenti (14 contro 4). Nonostante l'elevata prevalenza, i sintomi clinici riferibili a *Mh* e la vaccinazione sono stati osservati solo nella metà delle aziende campionate. La regressione stepwise ha mostrato che il ciclo aperto, il peso di messa a terra inferiore a 30 kg, la presenza di pavimentazione fessurata, l'adozione di ventilazione sia naturale che forzata e la vaccinazione contro l'influenza e la leptospirosi sono i principali fattori che predispongono l'insorgenza della malattia (Figura 1).

Figura 1. Odds ratio del peso dei fattori di rischio con probabilità di entrata = 0,025 e probabilità di uscita= 0,01
Figure 1. Odds ratio of risk factors weight probability of entrance =0.025 and probability of exit =0.01



L'esame microscopico ha rilevato, in soggetti positivi alla PEN, una broncopolmonite con iperplasia del tessuto linfoide associato ai bronchi (Figura 2B), perdita di ciglia (Figura 2D), accumulo di cellule infiammatorie nei lumi e intorno alle vie aeree, alveolite istiocitica e ispessimento dei setti inter-alveolari (Figura 2F). Le percentuali dei punteggi delle lesioni istologiche raggruppate in score basso (0-1) e alto (2-3) sono riassunte nella tabella 2.

Figura 2. Polmoni di suino sani (A, C and F) e con lesioni associate a PEN (B, D and F). A) reazione infiammatoria ridotta attorno alle vie respiratorie (HE, Bar= 150 mm); B) marcata iperplasia peribronchiale del BALT (HE, Bar= 150 mm); C) epitelio bronchiale normale (HE, Bar= 25 mm); D) Perdita delle ciglia accompagnata da infiltrazione di linfociti nella mucosa bronchiale (HE, Bar= 25 mm); E) infiltrazione cellulare ridotta nei setti alveolari (HE, Bar= 150 mm); F) marcata cellularità dei setti alveolari con essudazione intralveolare (HE, Bar= 150 mm).
Figure 2. Lungs of pigs without (A, C and F) and with PEN-associated tissue changes (B, D and F). A) reduced inflammatory reaction around an airway (HE, Bar= 150 mm); B) marked peribronchial BALT hyperplasia (HE, Bar= 150 mm); C) normal bronchial epithelium (HE, Bar= 25 mm); D) loss of cilia accompanied by lymphocyte infiltration of bronchial mucosa (HE, Bar= 25 mm); E) reduced cellular infiltration of alveolar septa (HE, Bar= 150 mm); F) marked cellularity of alveolar septa with intra-alveolar exudations (HE, Bar= 150 mm).

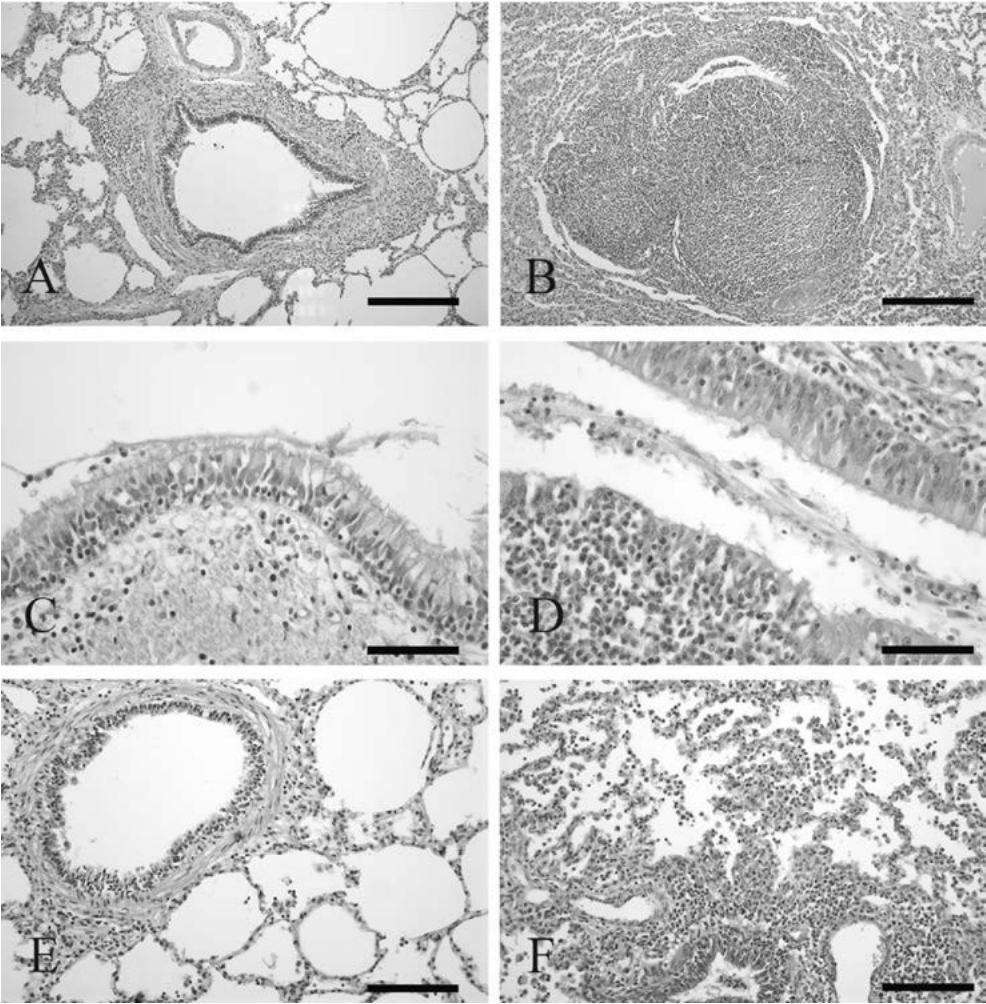


Tabella 2. Score istopatologico delle lesioni polmonari associate a PEN in soggetti vaccinati e non vaccinati per *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Table 2. Histopathologic score of PEN-associated lung lesions in subjects vaccinated and not vaccinated for *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Aziende	Ipereplasia BALT		P	Essudato bronchiale		P	Essudato alveolare		P	Cellularità interstiziale		P
	0-1 (%)	2-3 (%)		0-1 (%)	2-3 (%)		0-1 (%)	2-3 (%)		0-1 (%)	2-3 (%)	
Vaccinati N=8	49	51	<0.01	58	42	<0.01	66	34	<0.001	49	51	<0.01
Non vaccinati N=10	42	58		49	51		52	48		42	58	

La correlazione tra la gravità dei risultati istologici e la vaccinazione rivela che i soggetti vaccinati hanno una iperplasia del BALT inferiore ($p < 0,01$), minor essudato bronchiale ($p < 0,01$), alveolare ($p < 0,001$) e cellularità interstiziale ($p < 0,01$). A carico dei polmoni di suino con segni macroscopici e istopatologici di polmonite, è stata rilevata mediante immunoistochimica la presenza di antigeni *Mh* sulla superficie dei lumi bronchiali e bronchiolari, a differenza delle sezioni polmonari di soggetti senza polmonite. L'immunolocalizzazione dei linfociti T CD3 +, B CD79a + e macrofagi Iba-1 + nei diversi distretti polmonari di soggetti vaccinati e non vaccinati è mostrata in Figura 3 e la conta delle cellule immunitarie in Tabella 3.

Figura 3. Immunolocalizzazione cellulare nel BALT (A-F) e negli spazi intralveolari (G-L) di soggetti vaccinati (A, B e C e G, H e I) e non vaccinati (D, E e F e J, K e L) con PEN. A, D, G e J) immunoreazione con anti CD3+ MoAb, Linfociti T negli infiltrati peribronchiali e nei setti alveolari (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm); B, E, H e K) immunoreazione con anti CD79a MoAb, linfociti B negli infiltrati peribronchiali e nei setti alveolari (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm); C, F, I and L) immunoreazione con anti Iba-1 MoAb, macrofagi negli infiltrati peribronchiali e nei setti (Contrasto in ematossilina; Bar = 125 mm).

Figure 3. Immune cell immunolocalization in BALT (A-F) and inter-alveolar spaces (G-L) of vaccinated (A,B and C and G, H and I) and unvaccinated (D,E and F and J, K and L) pigs with PEN. A, D, G and J) immunolabeling with anti CD3+ MoAb, T lymphocytes scattered in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm); B, E, H and K) immunolabelling with anti CD79a MoAb, B lymphocytes in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm); C, F, I and L) immunolabeling with anti Iba-1 MoAb macrophages scattered in peribronchial infiltrates and in the alveolar septa (Hematoxylin counterstain, Bar = 125 mm).

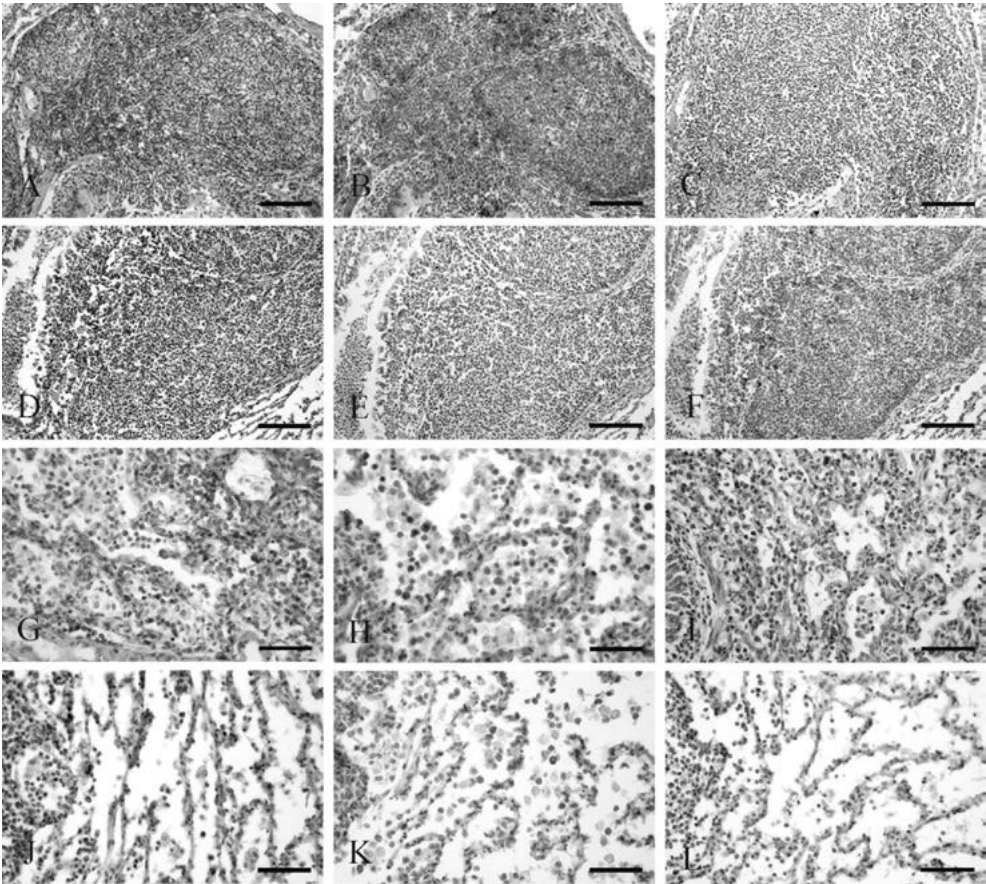


Tabella 3. Conta cellulare (cellule/1000 µm²) in polmoni di suino vaccinati e non vaccinati con e senza lesioni associate a PEN

Table 3. Immune cell counts (cells/1000µm²) in lungs of vaccinated and unvaccinated pigs with and without PEN-associated lesions.

Lesioni polmonari	BALT									
	Linfociti T		P	Linfociti B		P	Macrofagi		P	
	Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		
Assenti	7.7 ± 2.3	6.0 ± 3.0	NS	5.6 ± 3.0	2.0 ± 2.0	<0.001	1.5 ± 1.2	1.9 ± 1.3	NS	
Presenti	6.9 ± 2.3	5.7 ± 1.3	NS	1.3 ± 0.6	2.0 ± 0.8	<0.002	1.5 ± 0.9	0.5 ± 0.2	<0.001	
Parete bronchiale										
	Linfociti T		P	Linfociti B		P	Macrofagi		P	
	Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		
Assenti	2.9 ± 1.4	2.9 ± 1.0	NS	1.3 ± 0.6	1.2 ± 0.3	NS	0.8 ± 0.5	2.1 ± 2.2	NS	
Presenti	1.8 ± 0.5	1.8 ± 0.7	NS	1.0 ± 0.9	1.6 ± 0.4	0.008	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.3	0.005	
Lume intra-bronchiale										
	Linfociti T		P	Linfociti B		P	Macrofagi		P	
	Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		
Assenti	0.1 ± 0.1	0.2 ± 0.2	NS	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.2	NS	0.4 ± 0.4	0.1 ± 0.3	NS	
Presenti	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.2	NS	0.4 ± 0.4	0.6 ± 0.3	NS	0.4 ± 0.4	0.6 ± 0.5	NS	
Setti interalveolari										
	Linfociti T		P	Linfociti B		P	Macrofagi		P	
	Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		
Assenti	2.9 ± 2.2	5.8 ± 2.9	0.002	5.5 ± 2.3	3.3 ± 1.0	0.001	4.4±2.4	2.7±2.0	0.026	
Presenti	24 ± 16.5	14.5± 4.6	0.024	8.1 ± 3.0	11.7± 5.0	0.025	11.2± 8.2	3.8 ± 1.4	0.001	
Spazi intra-alveolari										
	Linfociti T		P	Linfociti B		P	Macrofagi		P	
	Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		Vaccinati	Non Vaccinati		
Assenti	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.3	NS	0.4 ± 0.3	0.4 ± 0.3	NS	0.6±0.3	0.9±0.8	NS	
Presenti	0.9 ± 0.8	0.8 ± 0.5	NS	0.7 ± 0.7	0.7 ± 0.2	NS	1.1±0.8	1.0±0.9	NS	

Gli studi immunoistochimici hanno rivelato dei cambiamenti nella distribuzione delle cellule immunitarie nei soggetti sottoposti o meno alla vaccinazione con o senza alterazioni polmonari associate a PEN. Nei suini vaccinati senza lesioni polmonari si è verificato un aumento dei linfociti B nel BALT (p <0,001) e a carico dei setti inter-alveolari (p <0,001). In presenza di alterazioni polmonari associate alla PEN, i suini vaccinati hanno mostrato una diminuzione dei linfociti B nel BALT (p <0,002), nella parete bronchiale (p <0,008) e nei setti inter-alveolari (p <0,025), un aumento del numero di linfociti T nei setti inter-alveolari (p <0,024) e un numero maggiore di macrofagi nel BALT (p <0,001), a carico della parete bronchiale (p <0,043) e dei setti inter-alveolari (p <0,001).

DISCUSSIONE

Attraverso la regressione stepwise il nostro studio ha confermato che il ciclo aperto è il principale fattore predisponente per la diffusione della PEN negli allevamenti suini (Mousing et al., 1990; Stark. 2000; Straw, 2006; Maes et al., 2008). Consentirebbe, infatti, la diffusione di agenti patogeni da una partita a un'altra, rendendo impossibile la costituzione di un'immunità di gruppo, in particolare negli allevamenti da ingrasso, i cui soggetti provengono da aree e contesti sanitari diversi. Al contrario, Backstrom e Bremere (1978), Scheidt et al., (1995), Stark et al. (1998) hanno suggerito che il ciclo chiuso possa influenzare la diffusione della PEN più di quello aperto. In particolare, Ostanello et al. (2006) hanno reputato la presenza di scrofe un importante serbatoio per l'infezione. Anche il peso di messa a terra è risultato essere un fattore importante: suinetti che intraprendono la fase di finissaggio con un peso inferiore a 30 kg sembrano essere più esposti all'infezione. Il finissaggio si configura, infatti, come un periodo di forte stress per i soggetti che in questa fase devono far fronte a diversi cambiamenti ambientali e alla formazione di nuovi gruppi di suinetti provenienti da scrofe diverse in cui si deve stabilire un equilibrio dipendente dall'instaurazione di una nuova gerarchia. Inoltre, nel nostro studio, il sistema ad accumulo e la ventilazione naturale e artificiale sono stati fattori rilevanti per l'insorgenza della PEN, perché legati a maggiori emissioni ammoniacali, che riducono l'attività ciliare delle cellule epiteliali (Bollwahn, 1989; Narita et al., 1995). Il ricorso al mangime medicato e la vaccinazione contro la leptospirosi e l'influenza suina, i quali sono risultati statisticamente significativi, sono a nostro avviso da considerare come conseguenze della PEN e da escludere dai fattori di rischio, in quanto solitamente gli allevamenti di suini con malattie respiratorie fanno uso di antibiotici (Jouglar et al., 1993; Kavanagh et al., 1994; Le Grand e Kobish, 1996; Walter et al., 2000; Alexander et al., 1980) e vaccinazioni come profilassi per limitare la diffusione dei patogeni respiratori. Il nostro studio ha confermato la presenza di alterazioni istologiche polmonari caratteristici nei suini PEN-positivi: iperplasia del tessuto linfoide associato ai bronchi, perdita di ciglia ed esfoliazione delle cellule epiteliali nel lume dei bronchi, macrofagi, neutrofili, a volte linfociti e plasmacellule infiltranti gli alveoli, ispessimento dei setti alveolari causato da edema, infiltrazione delle cellule infiammatorie e iperplasia e ipertrofia degli pneumociti di tipo II (Casalmiglia et al., 2000; Okada et al., 2000 Sarradell et al., 2003; Redondo et al., 2009; Hillen et al., 2014). Queste alterazioni istologiche correlano con la presenza di antigeni *Mh* nelle vie aeree di soggetti con PEN mentre, in accordo con altri studi, tali antigeni non sono stati rilevati all'interno delle cellule epiteliali, del BALT e dei macrofagi alveolari (Sarradell et al., 2003). I soggetti vaccinati presentavano lesioni meno gravi rispetto a quelli non vaccinati a livello delle vie aeree polmonari e del parenchima (Casalmiglia et al., 2000). Il ridotto essudato bronchiale e alveolare e il minore spessore dei setti hanno dimostrato che la vaccinazione aiuta a ridurre le lesioni polmonari associate all'PEN, modulando la risposta immunitaria come testimoniato nei lavori di Thacker et al., 2000 e Otaka et al.,2000). Gli studi

immunoistochimici, condotti con lo scopo di caratterizzare la distribuzione delle cellule immunitarie, hanno rivelato che a livello del BALT dei suini vaccinati senza segni di polmonite è presente un numero superiore di linfociti B rispetto a quelli non vaccinati che testimonia lo sviluppo di una risposta immunitaria umorale locale. Al contrario, i soggetti vaccinati con lesioni polmonari associate alla PEN, confermate dalla presenza di antigeni *Mh*, hanno mostrato una riduzione delle cellule B. Precedenti studi hanno dimostrato che una risposta immunitaria locale sembra svolgere un ruolo essenziale nella protezione dalle infezioni da micoplasma (Cassel et al., 1974; Howard et al., 1987).

Il nostro studio, sebbene sia stato condotto in campo, riesce a dimostrare lo sviluppo di una risposta immunitaria umorale locale contro *Mh* in suini vaccinati naturalmente infetti. A conferma dell'importanza di questa risposta immunitaria, i soggetti vaccinati con alterazioni riferibili a PEN hanno mostrato una riduzione dei linfociti B nel BALT e nei setti alveolari. D'altra parte, in questi soggetti è risultato altresì evidente un aumento dei linfociti T e dei macrofagi nelle aree polmonari che presentavano delle alterazioni.

Questi risultati sembrano confermare che le lesioni caratteristiche sviluppate nella PEN sono associate ad un'attivazione delle cellule T (Tajima et al, 1984) e ad un aumento dei macrofagi (Otaka et al., 2000) che, attraverso la produzione di citochine proinfiammatorie, portano ad un'esacerbazione della reazione infiammatoria.

Diversi studi hanno dimostrato come i macrofagi stimolati dalla presenza di antigeni *Mh* aumentino la produzione di queste citochine proinfiammatorie (Kwon et al., 2002, Sarradell et al., 2003, Rodriguez et al., 2004, 2007, Redondo et al., 2009).

In conclusione, questo studio condotto in condizioni di campo è riuscito a evidenziare i fattori di rischio che possono influenzare direttamente l'insorgenza della PEN, a confermare che la vaccinazione contro *Mh* può ridurre l'incidenza delle lesioni macroscopiche e istopatologiche indotte dall'agente patogeno e ha dimostrato come gli animali vaccinati sviluppino una risposta immunitaria locale a livello polmonare importante per prevenire alterazioni patologiche.

Inoltre, lo sviluppo di lesioni polmonari nei suini vaccinati sembra essere correlato allo sviluppo di una risposta immunitaria non protettiva mediata da linfociti T e macrofagi. Ulteriori indagini sono necessarie per identificare il fattore che regola la risposta immunitaria indotta dalla vaccinazione e i fattori predisponenti responsabili di questa rottura dell'immunità. Senza dubbio la vaccinazione migliora le condizioni di salute nell'allevamento, ma l'eradicazione della PEN può essere raggiunta solo attraverso una buona gestione.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo il Dr. Giuseppe Baricco per i suoi preziosi consigli e supporto.

BIBLIOGRAFIA

Alexander T.L.J., Thornton K, Boon G. and Lysons R.J. (1980) "Medicated early weaning to obtain pigs free from pathogens endemic in the herd of origin". *Vet Rec*, 106, 114-9.
 Bäckström L., Bremer H. (1978) "The relationship between disease incidences of fatteners registered at slaughter and environmental factors in herds". *Nord Vet Med*, 30, 526-533
 Bollwahn W. (1989) "Infektiöse Faktorenkrankheiten beim Schwein Pathogenese und Bekämpfung". *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 102, 410-2.
 Calsamiglia M., Collins J.E., Pijoan C. (2000) "Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR". *Vet. Microbiol.*, 76, 299-303.
 Cassell GH., Lindsey JR., Baker HJ. (1974) "Immune response of pathogen-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*. *J Immunol*, 112, 124-136.

Hillen S., von Berge S., Köhlerb K., Reinacherb M., Willemsa H., Reinera G. (2014) "Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies". *Prev Vet Med*, 113, 580- 588.
 Howard C.J., Thomas L.H., Parson K.R. (1987) "Immune response of cattle to respiratory mycoplasmas". *Vet Immunol Immunopathol*, 17, 401-412.
 Jouglar J.Y., Borne P.M., Sionneau G., Bardon T., Eclach D., (1993) "Evaluation de l'interet de l'association tiamuline - oxytetracycline dans la prevention des bronchopneumonies du porc charcutier". *Rev Med Vet*, 144, 981 - 988.
 Kavanagh N.T. (1994) "The effect of pulse medication with a combination of tiamulin and oxytetracycline on the performance of fattening pigs in a herd infected with enzootic pneumonia". *Irish Vet J*, 47, 58 - 61.
 Kwon D., Choi C. and Chae C. (2002) "Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs". *Vet Pathol*, 39, 584 - 587.
 Le Grand A, Kobisch M. (1996) "Comparaison de l'utilisation d'un vaccin et d'un traitement antibiotique sequentiel dans un élevage infecté par *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet. Med.*, 27, 241-253.
 Madec F., Kobish M. (1982) "Bilan lesionnel des porcs charcutiers a l'abattoir". *Journées de la Recherche Porcine en France*, 14, 405-412.
 Maes D., Segales J., Meyns T., Sibila M., Pieters M., Haesebrouck F. (2008) "Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs". *Vet. Microbiol.*, 126, 297-309.
 Mousing J., Lybye H., Barfod K., Meyling A., Ronsholt L., Willeberg P. (1990) "Chronic pleuritis in pigs for slaughter: an epidemiological study of infectious and rearing system related risk factors". *Prev Vet Med*, 9, 107-19.
 Narita M., Kawashima K., Morozumi T., Takashima H. (1995) "Effect of physical defences of the respiratory tract on the development of pneumonia in pigs inoculated endobronchially with *Actinobacillus pleuropneumoniae*". *J Vet Med Sci*, 57, 839-44.
 Okada M., Asai T., Ono M., Sakano T., Sato S. (2000) "Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs". *Vaccine*, 18, 2825-2831.
 Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Sala V. (2006) "Utilizzo del punteggio polmonare (*lung score*) nei suini italiani: validazione del metodo, valutazione della prevalenza e dei fattori di rischio associati all'infezione da *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Large animals review*, 12, 13-21.
 Redondo E., Masot A.J., Fernandez A., Gazquez A., (2009). "Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *J Com. Pathol* 140, 260 - 270.
 Rodriguez F., Ramirez G.A., Sarradell J., Andrada M., Lorenzo H. (2004) "Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*", *J Comp Pathol*, 130, 306 - 312.
 Rodriguez F., Quesada O., Poveda J.B., Fernandez A., Lorenz H., (2007). "Immunohistochemical detection of interleukin-12 and interferon-gamma in pigs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *J Comp Pathol*, 136, 79 - 82.
 Sarradell J., Andrada M., Ramirez A.S., Fernandez A., Gomez-Villamandos J.C., Jover A. et al., (2003). "A morphological and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*". *Vet Pathol*, 40, 395 - 404.
 Scheidt A, B., Cline T. R., Clark K., Mayrose V.B., Van Alstine, W.G., Diekman M.A., Singleton W.L., (1995). "The effect of all-in-all-out growing finishing on the health of pigs. *J Swine Health Prod*, 3, 202 - 205.

- Stärk K.D.C., Pfeiffer D.U., Morris R.S. (1998) “Risk factors for respiratory diseases in New Zealand pig herds”. *N Z Vet J*, 46, 3–10.
- Stärk K.D.C. (2000). “Epidemiological Investigation of the Influence of Environmental Risk Factors on Respiratory Diseases in Swine - A Literature Review”. *Vet J*, 159, 37–56.
- Straw B.E., Zimmermann J.J., D’Allaire S., Taylor D.J. (2006) “Diseases of Swine”, 9th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 1075–1098.
- Tajima M., Yagihashi T., Nunoya T., Takeuchi A., Ohashi F. (1984) Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs immunodepressed by thymectomy and treatment with antithymocyte serum. *Am J Vet Res*, 45, 1928 – 1932.
- Thacker E.L., Thacker B.J., Kuhn M., Hawkins P.A., Waters W.R. (2000) “Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs”. *Am. J. Vet. Res.*, 61, 1384- 1389.
- Walter D., Holck J.T., Sornsen S., Hagen C., Harris I.T. (2000) “The effect of a metaphylactic pulse dosing infeed antimicrobial strategy on finishing pig health and performance” *Swine Health Prod.*, 8, 65 – 71.

POSTERS

**EFFETTI DELL'IMPIEGO DI SACCHAROMYCES CEREVISIAE
VAR. BOULARDII NEI SUINETTI IN POST-SVEZZAMENTO
SULLE PERFORMANCE DI CRESCITA E SULLA RIMOZIONE
DI ANTIBIOTICI E OSSIDO DI ZINCO**

***EFFECT OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII
ADMINISTRATION IN POST-WEANING PIGLETS ON GROWTH
PERFORMANCE AND ANTIBIOTIC AND ZINC OXIDE REMOVAL***

AGAZZI A.¹, BONTEMPO V.¹, SAVOINI G.¹, BRAVO DE LAGUNA F.², BAZZOLI A.³

¹Department of Health, Animal Science and Food Safety, University of Milan,, Italy ;

²Lallemand SAS, Blagnac, France;³Lallemand Animal Nutrition, Italy

Parole chiave: suinetti, accrescimento, lievito.

Key words: piglets, growth performance, live yeast.

Riassunto: L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'effetto di LEVUCCELL SB (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079) sulle performance di crescita di suinetti in post-svezzamento con o senza la somministrazione di trattamenti antibiotici e ossido di zinco (ZnO) nella dieta. 288 suinetti (21 giorni di età, 6,52 kg ± 0,98) sono stati suddivisi in modo omogeneo sulla base del peso vivo iniziale e del sesso in 3 gruppi sperimentali in funzione dei trattamenti alimentari adottati: C) controllo, dieta di base con antibiotico e inclusione di ZnO nei mangimi prestarter e starter e solo inclusione di antibiotici nella terza fase di alimentazione; T1) C + 2x10⁹ CFU/kg di LEVUCCELL SB; T2) dieta di base con antibiotico e ZnO solo nella fase prestarter + 2x10⁹ CFU/kg di LEVUCCELL SB durante tutto il periodo sperimentale. I dati raccolti sono stati analizzati mediante una procedura MIXED del software SAS per misure ripetute. Il gruppo T1 ha evidenziato un maggior incremento ponderale medio giornaliero rispetto ai gruppi C e T2 (P <0.01) ed una tendenza al miglioramento della conversione alimentare (P <0.10) rispetto a C, mentre il gruppo T2 non ha mostrato differenze significative rispetto a C nelle performance di crescita. Il presente studio mostra come Levucell SB possa aiutare i suinetti nelle fasi critiche del post-svezzamento, migliorandone le performance produttive e giocando un ruolo significativo nelle strategie nutrizionali mirate alla riduzione dei mangimi medicati.

Abstract: The objective of the study was to evaluate the effects of LEVUCCELL SB (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079) on post-weaning piglets performance with or without removing antibiotics medication treatments and zinc oxide (ZnO) in the diet. 288 piglets (21 days old, 6.52 kg ± 0.98) were allotted to 3 homogenous dietary treatments on the basis of initial body weight and sex: C) control, basal diet with antibiotic and ZnO inclusion in the prestarter and starter phases, and antibiotic inclusion alone in the third dietary phase; T1) C + 2x10⁹ CFU/kg of LEVUCCELL SB; T2) basal diet with antibiotic and ZnO inclusion prestarter feed alone + 2x10⁹ CFU/kg of LEVUCCELL SB during the whole experimental period. Data were analysed by a MIXED procedure of SAS for repeated measurements. LEVUCCELL SB increased the average daily gain in T1 than both C and T2 groups (P<0.01) with a trend to improved feed conversion than C (P<0.10). No significant differences on growth performance were outlined between C and T2 piglets. The present study shows that LEVUCCELL SB can face the post-weaning challenges enhancing piglet's performance and playing a significant role in the nutritional strategies for the reduction of medicated feeds.

INTRODUZIONE

Le settimane successive allo svezzamento rappresentano un momento di particolare stress per il suinetto in cui spesso si assiste ad un calo dell'assetto immunitario e della capacità di risposta verso agenti patogeni esterni, una riduzione del consumo di alimento ed una conseguente diminuzione delle performance di crescita, anche in funzione di una microflora intestinale non ottimale (Bontempo et al., 2014; Jiang et al., 2015a,b).

La microflora intestinale svolge un'azione di primaria importanza nel mantenimento dello stato di salute e della produttività nei suini. Da questo punto di vista l'inclusione nella dieta e la somministrazione quotidiana di probiotici possono contribuire positivamente nel mantenimento di una popolazione microbica intestinale ottimale secondo due differenti meccanismi complementari: a) diminuendo la produzione di metaboliti tossici nel tratto gastrointestinale ed aumentando la produzione di enzimi, vitamine e sostanze antibatteriche; b) aumentando la resistenza della mucosa intestinale agli agenti patogeni e stimolando le naturali risposte del sistema immunitario (Lipiński et al., 2012). Sebbene siano stati identificati differenti meccanismi di azione dei probiotici in funzione della loro natura (Auclair, 2000), È stato dimostrato come la somministrazione di tali prodotti sia in grado di ridurre l'incidenza di diarrea sia di origine batterica (*E. coli*) che virale (*Rotavirus*) nelle specie animali (Musa et al., 2009).

Nello specifico, l'utilizzo di probiotici a base di *Saccharomyces cerevisiae*, è in grado portare ad un aumento della conta di lattobacilli e una riduzione di *E. coli* intestinali, con un conseguente miglioramento delle funzionalità digestive e di secrezione di alcuni enzimi gastrointestinali (Lipiński et al., 2012).

Levucell SB è un additivo microbico per mangimi (E1703) a base di cellule vive di lievito (*S. cerevisiae*, var. *Boulardii* ceppo CNCM I 1079) altamente concentrato e selezionato per migliorare le prestazioni dei monogastrici attraverso una regolazione della funzione intestinale e del suo equilibrio microbico. L'efficacia di Levucell SB sulla microflora dell'intestino e la sua azione di contrasto alla prevalenza di agenti patogeni nei suinetti è stata dimostrata nel corso degli anni (Brousseau et al., 2009, King et al., 2016), evidenziando un maggior stato di salute dell'intestino che porta ad un conseguente miglioramento delle performance di crescita nel post-svezzamento (Rosener et al., 2012).

Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare l'effetto di Levucell SB (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-1079) sulle performance di crescita dei suinetti post-svezzamento con o senza la somministrazione di antibiotici e ossido di zinco nella dieta.

MATERIALI E METODI

Per lo svolgimento dello studio sono stati utilizzati 288 suinetti (TOPIGS) svezzati a 21 giorni di età (peso iniziale 6.52 kg $\pm$ 0.98) e vaccinati contro Circovirus (PORCILIS PCV) e Mycoplasma (PORCILIS MYO). I suinetti sono stati divisi in tre gruppi sperimentali omogenei di 96 animali sulla base del peso vivo di partenza e dei trattamenti alimentari adottati. Ciascun gruppo sperimentale era composto da 48 maschi e 48 femmine suddivisi in box da 8 soggetti ognuno in funzione del sesso, per un totale di 6 replicazioni di maschi e 6 ripetizioni di femmine. Tutti i suinetti utilizzati nella prova sono stati allevati nella medesima sala di post-svezzamento per un totale di 36 box. I suinetti di sesso femminile sono stati distribuiti in due linee frontali di 9 box ciascuna; allo stesso modo i suinetti di sesso maschile sono stati distribuiti in due linee frontali di 9 box ciascuna. Ogni linea era composta da 3 box per ciascun gruppo sperimentale (9 box totali).

La somministrazione dei trattamenti alimentari è proseguita per i 50 giorni successivi allo svezzamento utilizzando un piano nutrizionale suddiviso in tre fasi: a) prestarter (0-11gg); b) starter 1 (12-13gg) e starter 2 (14-50gg).

I trattamenti alimentari adottati sono stati i seguenti: C) controllo, dieta di base con antibiotico e inclusione di ZnO nei mangimi prestarter e starter 1 e solo inclusione di antibiotici nella terza fase di alimentazione; T1) C + 2×10^9 CFU/kg di LEVUCCELL SB; T2) dieta di base con antibiotico e ZnO solo nella fase prestarter 1 + 2×10^9 CFU/kg di LEVUCCELL SB durante tutto il periodo sperimentale.

Gli antibiotici ed il dosaggio di ossido di zinco inclusi nei mangimi sperimentali nelle differenti fasi sono stati i seguenti: prestarter, amoxicillina (300ppm), colistina (120g/100kg di alimento), ZnO (2400ppm); starter1, doxiciclina (300ppm), tiamulina (150 ppm), ZnO (2400ppm); starter 2, licomicina (220ppm).

Il probiotico utilizzato è stato fornito da Lallemant SAS, Francia, e direttamente incluso nei mangimi sperimentali.

Le diete di base di ciascun gruppo sperimentale nelle tre differenti fasi hanno visto l'inclusione di orzo fioccato, farina d'orzo, farina di frumento, farina di mais, soia integrale, siero di latte e farina di soia proteica (48% proteina grezza) come componenti principali. Tutte le diete sono state distribuite ad libitum e formulate per essere isoenergetiche ed isoproteiche all'interno delle diverse fasi, coprendo o eccedendo i fabbisogni nutrizionali raccomandati dal National Requirements Council (NRC, 2012) per le rispettive fasi di ciclo produttivo. Tutti gli animali hanno avuto libero accesso all'acqua durante l'intero svolgimento della prova.

I mangimi sperimentali sono stati campionati all'inizio di ogni fase di alimentazione e analizzati per il contenuto di sostanza secca, proteine grezze, grassi grezzi, fibre grezze, ceneri, amido, zuccheri, Ca, P, Lisina e Met + Cys.

Il peso vivo di ciascun suinetto ed il relativo incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) sono stati rilevati e calcolati all'inizio dello studio (0 d), ad ogni cambio di fase di alimentazione (11 e 33 d) e alla fine della prova sperimentale (50 d). Al termine di ciascuna fase (11d, 13d e 50d) sono stati raccolti i dati di assunzione di alimento per ciascun box ed è stato calcolato l'indice di conversione alimentare (ICA).

Durante l'intera prova, i suinetti sono stati sottoposti a controllo quotidiano al fine di registrare tutte le possibili problematiche e attuare misure adeguate. Durante tutto il periodo di prova, sono stati registrati eventuali interventi sanitari, così come la mortalità.

L'incremento ponderale medio giornaliero, l'ingestione di alimento e la conversione alimentare (IPMG, IGM, ICA) dei suinetti sono stati analizzati mediante una procedura MIXED di SAS (The SAS Stat. V.9.3) per misure ripetute in cui l'unità sperimentale è stata rappresentata dal box. Il modello statistico ha tenuto in considerazione gli effetti principali legati al trattamento, al sesso, al tempo, considerando inoltre le interazioni trattamento x tempo, trattamento x sesso e trattamento x tempo x sesso. Inoltre, l'incremento totale e l'assunzione totale di alimento per box sono stati valutati mediante una procedura GLM di SAS (The SAS Stat. V.9.3) considerando gli effetti del trattamento, del sesso e dell'interazione trattamento x sesso.

Il livello di significatività è stato fissato per ^{A,B} $P \leq 0.01$ e ^{a,b} $P \leq 0.05$, mentre valori contenuti nell'intervallo $0.05 < P \leq 0.1$ sono stati considerati tendenze.

RISULTATI

L'effetto della somministrazione di lievito vivo (Levucell SB, *S. cerevisiae* var *boulardii* CNCM I-1079) su tutta la durata della prova sperimentale non ha evidenziato differenze significative nell'andamento del peso vivo e nel peso vivo finale tra i soggetti appartenenti ai tre gruppi sperimentali, sebbene sia stata rilevata una tendenza ($P=0.10$, tabella 2) del gruppo T1 nel confronto con T2 per un maggiore peso vivo medio ($P=0.04$). Il sesso ha influenzato il peso dei suinetti, dove i maschi sono risultati significativamente più pesanti rispetto alle femmine ($P=0.03$). Non sono state riscontrate ulteriori differenze in funzione delle interazioni

tra la dieta somministrata, i giorni di somministrazione e il sesso di appartenenza dei soggetti. La somministrazione di Levucell SB ha influenzato significativamente l'IPMG ($P < 0.01$, tabella 2), con valori più elevati per il gruppo T1 rispetto ai gruppi C ($P = 0.005$) e T2 ($P < 0.001$), mentre nessuna differenza è stata riscontrata nel confronto tra i gruppi T2 e C. similmente a quanto riportato per le variazioni del peso vivo dei soggetti sperimentali, nell'arco della prova non sono state riscontrate ulteriori differenze in funzione delle interazioni tra la dieta somministrata, i giorni di somministrazione e il sesso di appartenenza.

Tabella 1. Composizione chimica delle diete base (% sulla sostanza secca).
Table 1. Chemical composition of the experimental basal diets (% dry matter)

	Prestarter (0-11d)	Starter 1 (12-33d)	Starter 2 (34-50d)
SS	89.64	90.20	90.40
PG	19.70	18.15	18.25
LG	5.70	5.38	5.68
FG	5.14	5.16	4.90
Ceneri	5.40	5.35	4.99
Ca	1.03	1.12	0.98
P	0.62	0.64	0.59
Amido	43.23	43.03	41.70
Zuccheri	7.70	8.40	9.30
Lisina	1.37	1.35	1.14
Met + Cis	0.59	0.54	0.54
Treonina	0.88	0.88	0.77

L'assunzione dell'alimento non è stata influenzata da trattamenti alimentari adottati (tabella 2) sia considerando il consumo nelle diverse fasi alimentari ($P=0.60$), la media sull'intero periodo di prova ($P=0.11$), o il totale di alimento consumato da ciascun box ($P=0.14$). L'assunzione di alimento non è stata influenzata dal sesso di appartenenza dei suinetti così come dalle interazioni tra la dieta, i giorni di trattamento ed il sesso. Come risultato del rapporto tra alimento consumato ed incremento ponderale, l'analisi degli indici di conversione alimentare ha evidenziato una tendenza positiva ($P=0.08$) sull'efficienza di utilizzazione della dieta del gruppo T1 rispetto ai soggetti appartenenti al gruppo C (1.53 vs. 1.61, rispettivamente), mentre il sesso e le diverse interazioni testate non hanno influito significativamente sul parametro in oggetto.

Tabella 2. Performance di crescita di suinetti in post-svezzamento alimentati con Levucell SB (dati riferiti al box, n.8 soggetti/box).

Table 2. Growing performance of post-weaning piglet fed Levucell SB (all items are referred to the box, n8 subjects/box)

Gruppo					P						
Giorni/ periodo	C	T1	T2	SEM	Dieta	Sesso	Tempo	Dieta X Sesso	Dieta X Tempo	Dieta X Sesso X Tempo	
Peso vivo (kg)											
0	48.30	47.90	48.60	4.68	0.10	0.03	< 0.01	0.39	0.55	0.96	
11	62.50	63.32	61.64								
33	112.88	120.87	109.91								
50	176.59	189.40	172.64								
Incremento ponderale medio giornaliero (IPMG, g/d)											
0-11	1365	1469	1409	97.66	<0.01	0.20	<0.01	0.37	0.29	0.29	
12-33	2349	2616	2252								
34-50	3899	4264	3780								
0-50	2538 ^B	2783 ^A	2481 ^B								
Assunzione alimentare (kg/periodo)											
0-11	22.91	23.23	22.95	2.86	0.11	0.93	<0.01	0.30	0.69	0.52	
12-33	85.97	98.49	81.47								
34-50	113.09	117.55	110.50								
Totale	221.96	230.26	214.92	10.42	0.14	0.93		0.35			
Indice di conversione alimentare (ICA)											
0-11	1.50	1.42	1.42	0.04	0.08	0.43	<0.01	0.10	0.84	0.95	
12-33	1.62	1.56	1.60								
34-50	1.70	1.61	1.69								
0-50	1.61 ^(a)	1.53 ^(b)	1.57								

L'incidenza della mortalità per ciascuna delle tre fasi della dieta e nei tre gruppi sperimentali è riportata nella tabella 3. Gli animali del gruppo T1 hanno mostrato livelli più bassi di mortalità durante lo studio, sebbene nella fase 3 tutti i gruppi sperimentali mostrassero un numero e una percentuale di mortalità comparabile.

Tabella 3: Incidenza della mortalità in suinetti post-svezzamento (% , n.) alimentati con Levucell SB. Il numero e la percentuale si riferisce ai suinetti morti in ogni fase. La percentuale è stata calcolata sulla dimensione iniziale del gruppo (96 suinetti/gruppo).

Table 3. Mortality rate (% , n.) of postweaning piglets fed Levucell SB. Precentage and number are referred to the single rearing phases. Percentage have been calculated over the initial group consistency (96 subjects/group).

	Prestarter (0-11d)	Starter 1 (12-33d)	Starter 2 (34-50d)	Globale (0-50d)
C	1.05%(n.1)	4.17%(n.4)	5.21%(n.5)	10.42%(n.10)
T1	---%(n.0)	1.05%(n.1)	6.25%(n.6)	7.29%(n.7)
T2	3.13%(n.3)	4.17%(n.4)	4.17%(n.4)	11.46%(n.11)

DISCUSSIONE

Nel presente studio, la somministrazione di *S. cerevisiae* var. *boulardii* (CNCM I-1079, Levucell SB) per i cinquanta giorni successivi allo svezzamento ha mostrato un aumento significativo dell'IPMG, con un trend positivo nel miglioramento dell'indice di conversione alimentare dei suinetti trattati.

I risultati evidenziati dalla tendenza ad maggior capacità di conversione dell'alimento somministrato da parte dei suinetti alimentati con Levucell SB sembrano poter essere riconducibili ad una migliore efficienza nell'utilizzo della dieta a fronte della sostanziale equivalenza del consumo di alimento nei tre gruppi coinvolti nello studio. Le attività sperimentali hanno infatti evidenziato come l'uso concomitante di *S. cerevisiae* var. *boulardii*, antibiotici e ZnO o dei soli antibiotici, secondo lo schema sperimentale adottato, non sia in grado di modificare l'assunzione di alimento.

Oltre alla possibile efficacia sull'utilizzazione dei nutrienti, è stato spesso evidenziato come l'aggiunta di lieviti vivi nella razione possa aumentare la resistenza a diverse patologie e migliorare le performance attraverso un effetto positivo sulla risposta immunitaria ed il mantenimento di un ambiente intestinale favorevole agli animali (Lessard et al., 2009; Brousseau et al., 2015); in questo modo, il miglioramento dell'immunità da parte del lievito vivo potrebbe spiegare l'incremento delle prestazioni di crescita osservato.

È noto infatti che fenomeni di tipo infiammatorio o patologico che coinvolgano l'assetto immunitario, e a cui i suinetti sono particolarmente soggetti nel post-svezzamento (Bontempo et al., 2014; Jiang et al., 2015a,b), siano in grado di sottrarre dai processi metabolici coinvolti nell'accrescimento parte dell'energia assunta con la dieta, portando ad una riduzione delle performance produttive (Daiwen et al., 2008).

Ad oggi tuttavia, le informazioni sugli effetti di Levucell SB o di altri composti a base di *S. cerevisiae* in combinazione con antibiotico e ZnO nei suinetti dopo lo svezzamento sono scarse.

I miglioramenti significativi ottenuti nel presente studio su alcune performance di crescita, suggeriscono un effetto combinato della somministrazione di lievito vivo *S. cerevisiae* var. *boulardii* con antibiotici e ZnO somministrati contemporaneamente, piuttosto che il loro impiego disgiunto, portando ad effetti positivi sulla crescita.

Risultati simili sono stati in precedenza evidenziati da van Heugten et al. (2003) i quali suggeriscono che la somministrazione di lieviti vivi può essere efficace nel migliorare le prestazioni del suino, quando le diete contengono antimicrobici promotori di crescita.

A supporto di un miglior equilibrio microbico intestinale e di un conseguente aumento dello stato di salute mediante un effetto sinergico di lievito, antibiotico e concomitante integrazione di ZnO, nel presente studio è stata riscontrata una minore incidenza di mortalità nel gruppo T1 rispetto agli animali C o T2.

Inoltre, la somministrazione di Levucell SB ai suinetti nel post svezzamento ha evidenziato performance di crescita comparabili all'impiego di antibiotici e ZnO nella razione: non sono state infatti riscontrate differenze significative per quanto riguarda l'incremento giornaliero medio e l'indice di conversione alimentare tra i gruppi C e T2, nonostante quest'ultimo non presentasse alcuna inclusione di farmaco a partire dalla seconda settimana di prova.

CONCLUSIONI

Il presente studio mostra che la somministrazione di Levucell SB nei suinetti in post svezzamento per 50 giorni consecutivi è in grado di aumentare le prestazioni di crescita degli animali stessi, senza effetti negativi sull'assunzione di alimento. Inoltre, la somministrazione di Levucell SB permette di ottenere una performance di crescita paragonabile a quella ottenuta dall'inclusione di antibiotici e ossido di zinco.

Saccharomyces cerevisiae var *boulardii* CNCM I-1079 risulta essere una buona soluzione per fare fronte alle situazioni critiche del post svezzamento: o aumentando le performance o aiutando a ridurre i trattamenti con medicinali. Così, questo ceppo di lievito vivo può diventare una soluzione tra le strategie nutrizionali in un contesto di riduzione dei mangimi medicati.

BIBLIOGRAFIA

Auclair E. (2000). Yeast as an example of the mode of action of probiotics in monogastric and ruminant species. Cahiers Options Méditerranéennes (CIHEAM). 54, 45–53.

Bontempo V., Jiang X.R., Cheli F., Lo Verso L., Mantovani G., Vitari F., Domeneghini C., Agazzi A. (2014). Administration of a novel plant extract product via drinking water to post-weaning piglets: effects on performance and gut health. Animal. 8, 721–730.

Bontempo V., Giancamillo A.D., Savoini G., Dell’Orto V., Domeneghini C. (2006). Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-functional aspects and growth in weanling piglets. Anim Feed Sci Tech. 129, 224–36.

Brousseau J.P., Talbot G.F., Beaudoin K., Lauzon D.R., Lessard M. (2015). Effects of probiotics *Pediococcus acidilactici* strain MA18/5M and *Saccharomyces cerevisiae* subsp. *boulardii* strain SB-CNCM I-1079 on fecal and intestinal microbiota of nursing and weanling piglets. J. Anim. Sci. 93, 5313–5326.

Daiwen C., Keying Z., Chunyan W. (2008). Influences of lipopolysaccharide-induced immune challenge on performance and whole-body protein turnover in weanling pigs. Livest Sci, 113: 291-295.

Fanelli A., Agazzi A., Alborali G.L., Pilotto A., Bontempo V., Dell’Orto V., Demey V., Caputo J.M., Savoini G. (2015). Prevalence reduction of pathogens in poultry fed with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 19, 3-10.

Jiang X.R., Awati A., Agazzi A., Vitari F., Ferrari A., Bento H., Crestani M., Domeneghini C., Bontempo V. (2015a). Effects of a blend of essential oils and an enzyme combination on nutrient digestibility, ileum histology and expression of inflammatory mediators in weaned piglets. Animal 9, 417-426.

Jiang X.R., Agazzi A., Awati A., Vitari F., Bento H., Ferrari A., Alborali G.L., Crestani

M., Domeneghini C., Bontempo V. (2015b). Influence of a blend of essential oils and an enzyme combination on growth performance, microbial counts, ileum microscopic anatomy and the expression inflammatory mediators in weaned piglets following an *Escherichia coli* infection. *Anim Feed Sci and Techn.* 209, 219-229.

King, E., Richard, P., Samson, A., Schetelat, E., Le Bon, M., Dodd, C.E.R., Chevaux, E., Baulez, M., Mellits, K.H. (2016). Influence of weaning and live yeast on faecal bacteria populations in pigs. *Journées de la Recherche Porcine*, 48, 131-132.

Lessard M., Dupuis M., Gagnon N., Nadeau E., Matte J.J., Goulet J., Fairbrother J.M. (2009). Administration of *Pediococcus acidilactici* or *Saccharomyces cerevisiae boulardii* modulates development of porcine mucosal immunity and reduces intestinal bacterial translocation after *Escherichia coli* challenge. *J Anim Sci.* 87, 922-34

Lipiński K., Chrostowski G., Matusevičius P., Skórko-Sajko H. (2012). The effect of diets supplemented with *Saccharomyces cerevisiae boulardii* probiotic yeast on the reproductive performance of pregnant and lactating sows. *Veterinarija Ir Zootechnika.* 59, 40-44.

Musa H.H., Wu S.L., Zhu C.H., Seri H.I., Zhu G.Q. (2009). The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8, 313-321.

National Research Council (NRC) 2012. Nutrient requirements of swine, 11th revised edition. National Academic Press, Washington, DC, USA.

Rosener D. (2012). Evaluation of the efficacy of a live yeast (Levucell SB) against porcine proliferative enteropathy (PPE or ileitis) in a challenge model. AASV 43rd Annual Meeting of the American Association Swine Veterinary: Integrating Science, Welfare, and Economics in Practice. March 10-13, Denver, Colorado.

Van Heugten E., Funderburke D., Dorton K. (2003). Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J Anim Sci.* 81, 1004-1012.

I VIRUS DELL'INFLUENZA SUINA IN NORD ITALIA: CO-CIRCOLAZIONE DI DIVERSI GENOTIPI ED EVENTI DI RIASSORTIMENTO

SWINE INFLUENZA IN NORTHERN ITALY: CO-CIRCULATION OF DIFFERENT GENOTYPES AND REASSORTMENT EVENTS

CAVICCHIO, L.¹, FUSARO, A.¹, ZAMPERIN, G.¹, MILANI, A.¹, SCHIVO, A.¹,
MANTOVANI, C.¹, MONNE, I.¹, VIO, D.¹, SCHIAVON, E.¹, MION, M.¹, BEATO, M.S.¹

¹IZSVe, Viale dell'Università 10, Legnaro 35020, Padova, Italia;

Parole chiave: influenza suina, genotipi, novel

Key words: swine influenza, genotypes, novel

Riassunto: Il consorzio Europeo per la sorveglianza dei virus influenzali suini (European Surveillance Network for influenza in pigs – ESNIP) tra il 2009 e il 2013 ha caratterizzato geneticamente i virus circolanti nei Paesi aderenti creando un nuovo modello di classificazione (Watson et al. 2015). In totale sono stati caratterizzati 290 virus e definiti 25 diversi genotipi nominati da A a W. Il presente lavoro è il frutto della sorveglianza passiva condotta in Veneto e Friuli Venezia Giulia tra il 2013 e il 2017. In totale sono stati rilevati 15 allevamenti positivi al virus, localizzati in 15 differenti comuni di 4 diverse provincie. Con il fine di definire i genotipi circolanti nel territorio, il genoma completo dei 33 virus è stato caratterizzato mediante Illumina MiSeq. L'analisi filogenetica condotta per i virus classificati come H1 ha mostrato come questi appartenessero a 4 differenti genotipi: 1B.1.2.2 (human-like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1) pdm09), 1C.2 e 1C.2.1 (avian like H1N1 and H1N2). Le analisi filogenetiche condotte sull'intero genoma hanno identificato 8 differenti genotipi, di cui 6 precedentemente descritti in Europa (A, B, D, F, P e T) e 2 (X e Y), descritti nel presente lavoro per la prima volta. Considerando il potenziale zoonotico dell'influenza suina, la sorveglianza e la caratterizzazione molecolare dei virus circolanti si dimostra necessaria per monitorare l'emergenza di virus con potenziale pandemico.

Abstract: Passive surveillance of Swine Influenza virus (SIV) in north-eastern Italy (Veneto and Friuli Venezia Giulia regions), carried out between November 2013 and June 2017, identified fifteen infected farms in fifteen different municipalities covering four neighbouring provinces. Watson et al. (2015) had previously described 25 different SIV genotypes in Europe (A-W). To explore the genetic diversity of the circulating SIVs in north-eastern Italy, we genetically characterized the complete genome of 33 viruses (8 H1N1, 23 H1N2 and 2 H3N2) collected from all the affected farms using the Illumina MiSeq. Topology of the maximum likelihood phylogenetic tree obtained for the H1 gene showed that the viruses belonged to four distinct lineages, namely 1B.1.2.2 (human-like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1)pdm09), 1C.2 and 1C.2.1 (avian like H1N1 and H1N2), according to the classification by Anderson et al. (2016). Phylogenetic analyses of the eight gene segments identified 8 different genotypes - 6 (A, B, D, F, P and T) previously described by Watson et al. (2015) and 2 (X and Y) here described for the first time. The many reassortment events identified in this small geographic area, as well as the high number of co-circulating genotypes (F, P, T, X and Y) containing the matrix gene of the (A(H1N1) pdm09) lineage, may pose a potential public health risk and therefore their persistence in pigs should be carefully monitored.

INTRODUZIONE

L’influenza di tipo A causa infezioni in diverse specie di aviari e mammiferi, incluso l’uomo. Il virus dell’influenza A è composto da 8 segmenti genici di RNA a singolo filamento negativo. A causa della natura segmentata del genoma i fenomeni di riassortimento genico sono molto frequenti e questo tipo di fenomeno porta ad un incremento significativo della variabilità genotipica e fenotipica del virus. Le proprietà antigeniche del virus sono determinate da due glicoproteine di membrana, l’emoagglutinina (HA) e la neuraminidasi (NA), e in base a queste vengono classificati i diversi ceppi del virus. Gli eventi di riassortimento genico possono cambiare la combinazione degli HA ed NA esistenti portando alla generazione di nuovi genotipi, con caratteristiche fenotipiche nuove e sconosciuti da un punto di vista immunologico all’uomo. Tutto ciò è alla base delle ondate pandemiche che ciclicamente si sono verificate a livello globale. I virus appartenenti ai sierotipi H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1 pandemico sono quelli che abitualmente si riscontrano nella popolazione suina. Tali sierotipi sono meglio classificati in base al lineaggio genetico del gene dell’HA. Si identificano in tal modo virus Euroasian avian-like H1N1, human-like H1N2 e H1N1 pandemico. Un importante studio condotto dal consorzio Europeo “European Surveillance Network on 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 univoca per i virus influenzali suini circolanti in Europa. Tale classificazione, indipendentemente dal sierotipo 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) è predominante in Italia, o il genotipo D (human-like H1N2) principalmente circolante in Danimarca. Nel presente lavoro sono stati isolati e caratterizzati geneticamente 33 virus influenzali suini identificati attraverso sorveglianza passiva tra il 2013 e il 2017 nelle regioni di Veneto e Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

Nell’ambito della sorveglianza sindromica respiratoria sono stati inviati all’Istituto Zooprofilattico delle Venezie, tamponi nasali e in un singolo caso, a seguito di necropsopia, è stato inviato un polmone. I tamponi nasali sono stati stemperati in 2 ml di MEM (Sigma Aldrich), 0,5% di Albumina e HEPES buffer addizionato con 1% di antibiotici. La stessa soluzione (500µl) è stata utilizzata per l’omogeneizzazione di 20-40 mg di tessuto. Da tutti i campioni è stato estratto l’RNA mediante kit commerciale: High Pure RNA Isolation Kit (Roche) per i tamponi, High Pure RNA Tissue Kit (Roche), per i tessuti. Questi sono quindi stati testati mediante Real Time RT-PCR per influenza tipo A, avente come target il gene della proteina di matrice (M) (Hoffmann et al., 2010). I campioni positivi sono stati tipizzati mediante Real Time multiplex RT-PCR (Henritzi et al., 2016) in grado di differenziare i diverse genotipi del gene HA e NA. Una aliquota dello stemperato dei campioni positivi, a seguito di un incubazione a 37°C per 2 ore, è stata utilizzata per l’isolamento virale ottenuto mediante infezione di un monostrato confluyente di cellule MDCK-SIAT trattate con l’1% di tripsina TPCK (WHO Manual on animal influenza, 2002). I virus isolati sono stati nuovamente caratterizzati mediante RT-PCR come sopra illustrato e il loro 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 di sostituzione nucleotidica general time reversible (GTR) con una distribuzione gamma (con 4 gradi di variazione Γ_4), in PhyML (Guindon e Gascuel, 2003). La robustezza di ogni nodo dell’albero filogenetico è stata stabilita con il calcolo dei valori bootstrap (100 repliche).

RISULTATI

Nel presente studio sono stati individuati 33 virus, 24 in Veneto e 12 in Friuli Venezia Giulia, in un periodo compreso tra il 2013 e il 2017, in particolare nelle provincie di Padova, Treviso, Pordenone e Udine. Sono stati coinvolti 8 comuni nella provincia di Padova, 3 nella provincia di Treviso, 4 nella provincia di Pordenone, 1 nella provincia di Udine. In totale sono stati identificati i seguenti sottotipi: 8 H1N1, 23 H1N2, 2 H3N2. I virus H1 qui identificati appartengono a 4 differenti lineaggi: 1B.1.2.2 (human like H1N2), 1A.3.3.2 (A(H1N1) pdm09), 1C.2 e 1C.2.1 (avian like H1N1 e avian like H1N2) in base ad una recente classificazione (Anderson et al., 2016). L’analisi filogenetica dell’intero genoma (8 segmenti genici) ha evidenziato la presenza di 8 differenti genotipi, di cui 6 - A, B, D, F, P e T – precedentemente descritti in Europa (Watson et al., 2015) e 2 - X e Y – descritti per la prima volta in Italia. I due nuovi genotipi identificati sono stati generati dal riassortimento del genotipo F e T coinvolgendo rispettivamente i geni M e NS. In dettaglio il genotipo X, rispetto al genotipo F presenta il gene M del lineaggio pandemico. Il genotipo Y rispetto al genotipo T presenta il gene NS di origine Eurasian avian like (Tabella 1). La circolazione del genotipo X è stata riscontrata per la prima volta in Italia e quindi Europa, già a fine del 2013, contrariamente il genotipo Y è stato identificato nel 2017 e non in eventi precedenti. I due nuovi genotipi sono stati riscontrati solo nella provincia di Treviso. I genotipi A, D, F e P hanno circolato in maniera estesa nell’area considerata negli ultimi 3 anni, contrariamente i rimanenti genotipi sono stati rilevati solo in alcune aziende e solo per un breve periodo di tempo. Il genotipo T, la cui circolazione in Italia non era stata segnalata fino ad oggi, è stato identificato in due aziende del Friuli Venezia Giulia nel 2017. I virus appartenenti a questo genotipo (Tabella 1) clusterizzano separatamente rispetto agli altri virus Europei appartenenti al sottotipo avian like H1 (1C.2.), ciò potrebbe suggerire che siano stati generati a seguito di fenomeni di riassortimento indipendenti tra virus del lineaggio pandemico e virus appartenenti a lineaggio 1C.2.

Tabella 1. Genotipi identificati nelle regioni del Veneto e Friuli Venezia Giulia tra il 2013 e il 2017.
Table 1. Identified genotypes in Veneto and Friuli Venezia Giulia regions between 2013 and 2017.

Sottotipo Subtype	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	NS	M	Genotipo Genotype
H1N2	1B.1.2.2	N2							X
H1N2	1B.1.2.2	N2							F
H1N2	1C.2	N2							D
H1N1	1C.2.1	N1							A
H3N2	H3	N2							B
H1N1	1A.3.3.2	N1							P
H1N2	1C.2	N2							D
H1N2	1C.2.	N2							Y
H1N2	1C.2.	N2							T
H3N2	H3	N2							B

Classificazione di Watson dei genotipi di influenza suina circolanti in Europa:
Watson classification of different swine influenza strains circulating in Europe:

	A(H1N1)pdm09
	A/swine/Scotland/410440/1994-like H1huN2
	Eurasian avian-like H1avN1
	A/swine/Italy/4675/2003-like N2
	A/swine/Gent/1/1984-like H3N2

DISCUSSIONI

La presenza del genotipo F in Italia è stata descritta sin dal 2003 (Moreno et al., 2013; Watson et al., 2015), e il presente studio conferma la presenza di tale genotipo nel territorio. In una area geografica non particolarmente vasta, come quella oggetto del presente studio, sono stati identificati molteplici genotipi circolanti (8) e due eventi di riassortimento responsabili della genesi di due nuovi genotipi (X e Y). La circolazione di genotipi (X, Y, P e T) contenenti il gene M appartenente al lineage A(H1N1)pdm09, il quale è stato precedentemente associato ad una aumentata trasmissibilità virale in modelli animali quali il furetto e il criceto (Kitikoon et al., 2012; Lakdawala et al., 2011), potrebbe rappresentare un potenziale rischio per la sanità pubblica, pertanto la loro circolazione dovrebbe essere monitorata attentamente.

CONCLUSIONI

Lo studio del genoma completo dei virus influenzali suini identificati tramite sorveglianza passiva nel Nord-Est Italia tra il 2013 e il 2017, ha permesso di caratterizzare la costellazione genetica dei virus circolanti nel territorio. L'identificazione di una molteplicità di varianti genetiche sottolinea l'importanza di applicare adeguati piani di monitoraggio per l'influenza suina nell'area coinvolta nell'indagine. Ulteriori indagini volte a caratterizzare le proprietà antigeniche, la cross-reattività con i vaccini disponibili, la virulenza e l'efficacia di replicazione/trasmissione in modelli animali distinti dei ceppi virali qui descritti sono necessarie al fine di monitorare l'adeguatezza dei sistemi di controllo implementati attualmente e di poter prontamente identificare l'emergenza di virus con potenziale zoonotico.

BIBLIOGRAFIA

- Anderson T.K., Macken C.A., Lewis N.S., Scheuermann R.H., Van Reeth K., Brown I.H., Swenson S.L., Simon G., Saito T., Berhane Y., Ciacci-Zanella J., Pereda A., Davis C.T., Donis R.O., Webby R.J., Vincent A.L. (2016) "A Phylogeny-Based Global Nomenclature System and Automated Annotation Tool for H1 Hemagglutinin Genes from Swine Influenza A Viruses." *mSphere*. 1(6), e00275-16.
- Guindon S., Gascuel O. (2003) "A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood." *Syst Biol*. 52(5), 696-704.
- Henritzi, D., Zhao, N., Starick, E., Simon, G., Krog, J.S., Larsen, L.E., Reid, S.M., Brown, I.H., Chiapponi, C., Foni, E., Wacheck, S., Schmid, P., Beer, M., Hoffmann, B., Harder, T.C. (2016) "Rapid detection and subtyping of European swine influenza viruses in porcine clinical samples by haemagglutinin- and neuraminidase-specific tetra- and triplex real-time RT-PCRs." *Influenza Other Respir Viruses*. 10(6), 504-517.
- 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.

- 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., Hjulager, 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.

CARATTERIZZAZIONE DI MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TIPO 3 DURANTE UN FOCOLAIO DI PED NELLA REGIONE VENETO

CHARACTERIZATION OF MAMMALIAN ORTHOREOVIRUS TYPE 3 DURING A PED OUTBREAK IN VENETO REGION

CAVICCHIO L.¹, ZAMPERIN G.¹, TASSONI L.¹, MION M.¹, RIZZO G.¹, MILANI A.¹, SALVIATO A.¹, TONON F.², BEATO M.S.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (PD); ²Suivet, Padova.

Parole chiave: Suini, MRV, PED

Key words: Swine, MRV, PED

Riassunto: I Mammalian Orthoreovirus (MRV) sono virus ad RNA a doppio filamento segmentato, appartenenti alla famiglia *Reoviridae*. Gli MRV sono in grado di infettare diverse specie di mammiferi, incluso uomo, pipistrello e suino, causando infezioni asintomatiche o respiratorie o gastroenteriche. Sono stati identificati tre sierotipi: MRV1, MRV2, MRV3. Tale suddivisione è strettamente legata al gene S1, coinvolto nell'adesione del virus alla cellula ospite e nel tropismo tissutale. MRV3 è stato rilevato in suini con sintomi gastroenterici e diarrea in Cina e Corea del Sud e nel 2014 negli USA, durante focolai di diarrea epidemica suina (PED). La prima segnalazione di MRV3 in suini in Europa (2015) avviene durante un focolaio di PED in Italia (Lombardia). Nel presente studio riportiamo l'isolamento e la caratterizzazione genetica, mediante approccio metagenomico, di MRV3, durante un focolaio di PED in Veneto, nel 2016. La sequenza del gene S1 mostra una correlazione con MRV isolati da suino in Lombardia nel 2015, da uomo in Slovenia nel 2013 e in Svizzera nel 2018, da pipistrelli in Italia nel 2012. Per tutti gli altri segmenti, l'MRV3 identificato in Veneto mostra una maggiore omologia con i ceppi di origine suina ed umana. Data l'importanza della PED per il settore suino, è necessario approfondirne l'associazione con MRV. Inoltre, l'identificazione di MRV correlati a ceppi umani e di pipistrello evidenzia la necessità di condurre studi sul potenziale zoonotico di tale virus.

Abstract: Mammalian Orthoreoviruses (MRV) are segmented dsRNA viruses belonging to the *Reoviridae*. MRVs can infect a variety of mammalian species, including humans, bats and swine, causing asymptomatic, respiratory, or gastroenteric infections. Three MRV serotypes have been identified, MRV1, MRV2 and MRV3. This distinction is strictly related to the S1 gene segment, responsible for virus attachment and tissue tropism. MRV3 was detected in swine showing gastro-enteric signs and diarrhea in China and South Korea, and, in 2014, in USA, during Porcine Epidemic Diarrhea (PED) outbreaks. The first detection of swine MRV3 in Europe was in 2015 during severe PED outbreaks in Italy (Lombardia region). Here we report the isolation and genome characterization, by metagenomics approach, of MRV3 detected during a PED outbreak in Veneto region, in 2016. The obtained S1 sequence showed correlation with MRV3 isolated in 2015 in Lombardia, with strains from Italian bats detected in 2012, with MRV3 from a child with acute gastroenteritis detected in Slovenia in 2013 and a MRV3 from an immunocompromised child from Switzerland (2018). For all the other genes, the 2016 MRV isolate shows a higher genetic similarity with other swine and human MRV strains. Given the importance of PED for the pig industry, it would be crucial to investigate the association with MRV. Moreover, the detection of an MRV3 with high homology to human and bat isolates warrants further studies on the zoonotic potential of such virus.

INTRODUZIONE

I Mammalian Orthoreovirus (MRV) sono virus ad RNA a doppio filamento appartenenti alla famiglia *Reoviridae*, genere *Orthoreovirus*. Il nome Reovirus deriva dall'acronimo inglese "Respiratory Enteric Orphan Virus" utilizzato per la prima volta negli '50 per definire un gruppo di virus che occasionalmente si isolavano dal tratto respiratorio ed enterico di pazienti con lievi sintomi respiratori o gastrointestinali (1). I virus appartenenti al genere *Orthoreovirus* sono suddivisi in 5 specie in base al tipo di ospite che sono in grado di infettare: Reptilian *Orthoreovirus*, Avian *Orthoreovirus*, Pteropine *Orthoreovirus*, Baboon *Orthoreovirus* e Mammalian *Orthoreovirus*. Questi virus infatti si riscontrano in rettili, uccelli, piante, funghi, protozoi, mammiferi incluso l'uomo (2). Privi di envelope, a simmetria icosaedrica, hanno dimensioni attorno agli 80 nm e sono quindi ben visibili al microscopio elettronico. Sono suddivisi in fusogenici e non fusogenici in base al tipo di effetto citopatico che sono in grado di causare: i ceppi fusogenici sono in grado di portare alla formazione di grandi sincizi plurinucleati (1). Il genoma, degli MRV, di circa 23000bp, è costituito da 10 segmenti genici suddivisi in base alle dimensioni: 3 segmenti Large (L) da circa 3800bp, 3 Medium da circa 2200 bp (M), 4 Small (S) da circa 1100bp ciascuno. A causa del genoma segmentato, all'interno degli MRV si riscontrano frequentemente genotipi ricombinanti o riassortanti (1). Gli MRV, in base all'attività neutralizzante degli antisieri e all'attività di inibizione dell'emoagglutinazione, sono classificati in tre differenti sierotipi: MRV1, MRV2, MRV3, (4). Tali capacità sembrano essere connesse al gene S1, codificante una proteina capsidica (σ 1), responsabile dell'adesione del virus ai recettori cellulari e legata quindi al tropismo tissutale. In relazione alla classificazione filogenetica basata sul segmento S1, sono stati individuati dei ceppi prototipo: Tipo 1 Lang – T1L, Tipo 2 Jones – T2J, Tipo 3 Dearing – T3D e Tipo 3 Abney – T3A, recentemente è stato proposto un ulteriore sierotipo, Tipo 4 Ndelle – T4N (5). Gli MRV hanno una vastissima distribuzione geografica e sono teoricamente in grado di infettare tutti i tipi di mammiferi, in particolare sono stati riscontrati nel suino, nel pipistrello e nell'uomo dove sono stati associati ad infezioni sia asintomatiche che sintomatiche (1, 6, 7, 8, 9). Tuttavia, negli ultimi anni, gli MRV sono stati spesso descritti come l'unico agente patogeno in ospiti affetti da gravi enteriti emorragiche, acute infezioni respiratorie ed encefaliti. La trasmissione degli MRV avviene non solo attraverso un contatto diretto ma anche per via indiretta, ad esempio tramite il consumo di acqua o cibo contaminati; inoltre l'elevata capacità del virus di persistere al di fuori dell'ospite e la presenza ubiquitaria nell'ambiente, rendono gli MRV importanti virus a potenziale zoonotico (9). Recentemente, sono stati segnalati casi di diarrea neonatale e sintomatologia nervosa in bambini, associati ad MRV di tipo 2 e 3 in Europa, Asia e Nord America (1, 6, 10). In uno studio condotto nel 2011, si ipotizza che un nuovo ceppo di MRV2 umano isolato in America sia originato da fenomeni di riassortimento tra ceppi umani e suini (1). Nel 2013, in Slovenia, un MRV1 avente un'elevata omologia per il gene S1 con gli MRV isolati da pipistrelli europei, è stato rilevato come unico agente eziologico di gastroenterite in un bambino di 17 mesi (9). Le prime sequenze disponibili per MRV isolato da suino risalgono al 1998 (Austria). Successivamente è stato riscontrato in Cina, Corea del Sud, USA, Italia (8, 11, 12, 13,14). Nella maggioranza dei casi si tratta di ritrovamenti di MRV3 in suini con problemi respiratori, gastroenterici e diarrea associati ad altri patogeni intestinali. Nel 2014, MRV3 è stato rilevato in Nord America in concomitanza di focolai di PED (Porcine Epidemic Diarrhea) (13). Il ceppo americano presenta un'elevata omologia con MRV3 identificati in pipistrelli europei ed è stato dimostrato essere in grado di causare patologia gastroenterica a seguito di infezione sperimentale di suinetti. In Italia, MRV3 è stato identificato in feci di suino durante focolai di PED in Lombardia nel 2015 (8). L'analisi di sequenza del ceppo italiano ha rilevato un'elevata similarità del gene S1 con quello di ceppi MRV3 identificati in pipistrelli in Italia

e in casi di gastroenterite acuta infantile segnalati in Slovenia nel 2013 e in Svizzera nel 2018 (9, 11). Il presente lavoro descrive l'identificazione e la caratterizzazione di un ceppo di MRV3 riscontrato nel 2016 in un allevamento di suini in Veneto, nella provincia di Treviso, durante un focolaio di PED.

MATERIALI E METODI

Nel Febbraio 2016 in provincia di Treviso, nella regione Veneto, sono stati riscontrati dei casi di gastroenterite in un allevamento a ciclo chiuso di circa 180 capi. Gli episodi di diarrea sono stati osservati in suini da ingrasso per 5-6 giorni senza che vi fosse alcuna mortalità; sono quindi stati prelevati 6 campioni di feci da 6 animali diversi. Tutti i campioni sono stati testati mediante Real time RT-PCR per la ricerca del virus PED (RealPCR PEDV/PDCoV Multiplex RNA Test (IDEXX)). Un grammo di ciascun campione di feci è stato diluito ed omogenizzato in 9ml di Phosphate Buffered Saline (PBS) contenente antibiotici (10000 UI/ml di penicillina G, 100mg/ml di streptomycin, 50000 UI/ml nistatina, 2,5 mg/ml gentamicina solfato), e chiarificato mediante centrifugazione a 400xg per 10 minuti. Gli omogenati sono quindi stati utilizzati per inoculare monostrati confluenti di cellule VERO (African green monkey kidney). Le cellule vero sono state coltivate in terreno di crescita costituito da Minimal Essential Medium (MEM) con l'aggiunta di 0,25µg/ml di amfotericina e 0,05µg/ml gentamicina. I monostrati, dopo l'eliminazione del terreno di crescita, sono stati inoculati per adsorbimento con i campioni in esame e terreno di post-inoculazione ovvero MEM addizionato con brodo di triptoso fosfato (0,3%), estratto di lievito (0,02%), e tripsina 5µg/ml. I monostrati sono stati incubati a 37°C a 5% di CO₂ per due ore e successivamente osservati, quotidianamente per 6 giorni, in modo da rilevare l'eventuale insorgenza di effetto citopatico. In assenza di effetto citopatico sono stati effettuati due passaggi ciechi per confermarne la negatività. Il surnatante delle colture con effetto citopatico è stato sottoposto ad osservazione mediante microscopio elettronico. L'RNA delle medesime colture è stato estratto mediante il kit Cador Pathogen mini kit (QIAGEN) seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso. L'RNA estratto dalle colture cellulari e l'RNA estratto dai campioni di feci sono stati analizzati mediante RT-PCR avente come target una regione conservata del gene L1 dei MRV (7). I campioni positivi per L1 sono stati testati mediante un RT-PCR specifica per MRV3 avente come target una regione del gene S1 (7). In entrambi i casi è stato utilizzato il kit One step RT-PCR (QIAGEN) secondo le istruzioni d'uso e una concentrazione dei primers pari a 0,4 µM. Una delle colture avente effetto citopatico è stata scelta per l'analisi con approccio metagenomico, mediante Illumina MiSeq. L'RNA estratto è stato retrotrascritto a cDNA a singolo filamento usando esamers random e l'enzima SuperScript III RT kit (Invitrogen) seguendo le indicazioni suggerite dalla ditta produttrice; il cDNA a doppio filamento è stato ottenuto utilizzando il kit Second strand cDNA synthesis (NewEnglandBiolabs). Le read sono state qualitativamente filtrate e, tramite analisi metagenomica, e sono state selezionate solamente quelle riconducibili alla famiglia dei Reoviridae. Poiché gli orthoreovirus hanno un genoma formato da 10 segmenti, le read selezionate sono state allineate tramite BLAST contro il database NT. Gli allineamenti sono stati controllati manualmente in modo da assegnare le read a 10 gruppi diversi, ognuno dei quali rappresenta uno dei 10 segmenti genici. Le read di ogni gruppo sono state indipendentemente assemblate con approccio de novo tramite IDBA-UD e GapFiller per produrre il segmento corrispondente. Infine le read selezionate sono state allineate tramite BWA contro i 10 segmenti prodotti e il risultato è stato manualmente controllato con Tablet. Gli allineamenti sono stati generati mediante Clustal W, mentre gli alberi filogenetici sono stati costruiti mediante Neighbor-joining utilizzando il software MEGA5.2, con un'analisi di bootstrap da 1000 repliche e Maximum Likelihood come modello di sostituzione nucleotidica.

RISULTATI

Tutti i campioni di feci sono risultati positivi per PED e negativi mediante RT-PCR avente come target il segmento L1 di MRV. E' stato possibile osservare un effetto citopatico, al secondo passaggio in cellule VERO per 2 dei 6 campioni di feci, al terzo passaggio per 2 campioni, al quarto passaggio per 1 campione e solo 1 campione di feci è risultato negativo all'isolamento virale. Nel caso di positività è stato possibile osservare la completa distruzione del monostrato cellulare senza la formazione di strutture sinciziali. La microscopia elettronica, effettuata sul surnatante delle cellule infettate mostrando effetto citopatico, ha rilevato la presenza di numerose particelle virali con simmetria icosaedrica e prive di envelope, compatibili quindi con la struttura morfologica di *Reoviridae*. Le colture cellulari sono risultate positive mediante RT-PCR avente sia target L1 che S1 tipo 3. Di tutti i segmenti genici è stato possibile ottenere la sequenza completa di un campione di coltura cellulare rappresentativo. Il segmento S1 presenta inoltre un grado di similarità con le sequenze di ceppi isolati da pipistrelli italiani e da casi umani in Slovenia e Svizzera del 98%, mentre i restanti segmenti genici presentano una maggiore similarità con virus suini e umani con percentuali dal 90 al 94%. Le sequenze ottenute mostrano una correlazione non elevata del ceppo isolato in Veneto (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016) con quello isolato in Lombardia nel 2015 (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015), i segmenti più simili S1, L1 ed L3 hanno percentuali di similarità rispettivamente del 96,7 %, 94,8%, 94,6% (Figura 1). Per la costruzione degli alberi filogenetici sono state utilizzate tutte le sequenze di MRV presenti in Genbank, ad eccezione degli alberi relativi al gene S1 per cui ci si è limitati alle sole sequenze di MRV3. L'analisi filogenetica suggerisce per il segmento S1 la presenza di 3 gruppi monofiletici all'interno di MRV3: un primo gruppo costituito dai ceppi Asiatici, prevalentemente di origine suina, un secondo gruppo costituito dai ceppi Americani e Canadesi, e un terzo gruppo che comprende tutti i ceppi europei isolati da pipistrello (Figura 2). Entrambi i ceppi italiani e il ceppo Americano isolati da suino appartengono a quest'ultimo gruppo. L'analisi effettuata sul segmento L2, sembra invece correlare il virus caratterizzato con i virus isolati da suini in Cina nel 2011.

DISCUSSIONE

Il presente studio conferma la presenza di MRV3 in associazione a PED nel territorio italiano. Simile associazione era già stata riscontrata negli USA nel 2014. MRV è inoltre spesso associato con altri virus enterici in suini che presentano diarrea (15). I meccanismi alla base dell'associazione di MRV e PED risultano incompresi e di difficile definizione. L'evidenza che MRV3 sia in grado sperimentalmente di causare sintomatologia gastroenterica (13), potrebbe far ipotizzare che la sintomatologia osservata durante focolai di PED possa essere esacerbata da MRV, quando presente. Tutti i ceppi MRV fino ad ora riscontrati in associazione con PED, il ceppo americano del 2014 e i due italiani del 2015 e 2016, mostrano una correlazione del gene S1, con ceppi di MRV isolati da pipistrelli europei. L'omologia genetica del gene S1 di MRV3 di suino identificati in Italia con virus circolanti nella popolazione di chiroterteri italiana, suggerisce un possibile meccanismo di trasmissione inter-specie suino-pipistrello, come ad esempio già osservato per i Nipah virus. I due ceppi italiani ad eccezione del gene S1, risultano diversi tra loro. Tuttavia l'analisi filogenetica evidenzia come i due ceppi clusterizzino insieme per i geni S1, S2, S4, M1, L1, L3 suggerendo che per questi segmenti possano condividere un progenitore comune. L'assenza di dati sulla distribuzione di MRV nella popolazione suina, e la carenza di informazioni sulla diversità genetica di MRV isolati da suino e da pipistrello in Italia e in Europa, non permettono di avanzare ipotesi in merito ai meccanismi di trasmissione inter-specie suino-pipistrello.

CONCLUSIONE

Il ruolo di MRV (1, 2 e 3) nella patologia dei disturbi gastroenterici nei suini necessita ulteriori approfondimenti. In particolare la co-circolazione di MRV3 e PED andrebbe studiata maggiormente per comprendere il meccanismo alla base di tale co-infezione. A tal fine, la presenza di MRV3 dovrebbe essere indagata durante i focolai di PED.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC 17/16).

BIBLIOGRAFIA

1. Ouattara L.A., Barin F., Barthez M.A., Bonnaud B., Roingeard P., Goudeau A., Castelnau P., Vernet G., Paranhos-Baccalà G., Komurian-Pradel F. (2011) "Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy." *Emerg Infect Dis.* 17, 1436-1444.
2. Duncan R. (1999) "Extensive sequence divergence and phylogenetic relationships between the fusogenic and nonfusogenic orthoreovirus: a species proposal." *Virology.* 260, 316-328.
3. Day J.M. (2009) "The diversity of the orthoreoviruses: molecular taxonomy and phylogenetic divides." *Infect Genet Evol.* 9, 390-400.
4. Rosen L. (1960) "Serologic grouping of reoviruses by hemagglutination-inhibition." *Am J Hyg.* 71, 242-9.
5. Attoui H., Biagini P., Stirling J., Mertens P.P., Cantaloube J.F., Meyer A., de Micco P., de Lamballerie X. (2001) "Sequence characterization of Ndelle virus genome segments 1, 5, 7, 8, and 10: evidence for reassignment to the genus Orthoreovirus, family Reoviridae." *Biochem Biophys Res Commun.* 287, 583-8.
6. Tyler K.L., Barton E.S., Ibach M.L., Robinson C., Campbell J.A., O'Donnell S.M., Valyi-Nagy T., Clarke P., Wetzel J.D., Dermody T.S. (2004) "Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis." *J Infect Dis.* 189, 1664-75.
7. Lelli D., Moreno A., Lavazza A., Bresola E., Canelli E., Boniotti M. B., Cordioli P. (2012) "Identification of Mammalian orthoreovirus type 3 in Italian bats." *Zoonoses Public Health.* 60, 84-92.
8. Lelli D., Beato M.S., Cavicchio L., Lavazza A., Chiapponi C., Leopardi S., Baioni L., De Benedictis P., Moreno A., (2016) "First identification of mammalian orthoreovirus type 3 in diarrheic pigs in Europe" *Virology.* 513, 139.
9. Steyer A., Gutiérrez-Aguirre I., Kolenc M., Koren S., Kutnjak D., Pokorn M., Poljšak-Prijatelj M., Racki N., Ravnikar M., Sagadin M., Fratnik Steyer A., Toplak N. (2013) "Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis." *J Virol.* 87, 3818-3825.
10. Chua K.B., Voon K., Crameri G., Tan H.S., Rosli J., McEachern J.A., Suluraju S., Yu M., Wang L.F. (2001) "Identification and characterization of a new orthoreovirus from patients with acute respiratory infections." *PLoS One.* 3, e3803.
11. Lewandowska D., Capaul R., Prader S., Zagordi O., Geissberger F.D., Kügler M., Knorr M., Berger C., Güngör T., Reichenbach J., Shah C., Böni J., Zbinden A., Trkola A., Pachlopnik Schmid J., Huber M. (2018) "Persistent mammalian orthoreovirus, coxsackievirus and adenovirus co-infection in a child with a primary immunodeficiency detected by metagenomic sequencing: a case report." *BMC Infect Dis.* 18, 33.
12. Nayaranappa A. T., Sooryanarain H., Deventhiran J., Cao D., Ammayappan Venkatachalam B., Kambiranda D., LeRoith T., Heffron CL., Lindstrom N., Hall K.,

- Jobst P., Sexton C., Meng XJ., Elankumaran S. (2015) "A novel pathogenic Mammalian orthoreovirus from diarrhetic pigs and Swine blood meal in the United States" *MBio*. 6, e00593-15.
13. Zhang C., Liu L., Wang P., Liu S., Lin W., Hu F., Wu W., Chen W., Cui S. (2011) "A potentially novel reovirus isolated from swine in northeastern China in 2007." *Virus Genes*. 43, 342-9.
14. Dai Y., Zhou Q., Zhang C., Song Y., Tian X., Zhang X., Xue C., Xu S., Bi Y., Cao Y. (2012) "Complete Genome Sequence of a Porcine Orthoreovirus from Southern China." *J Virol*. 86, 12456.
15. Know H.J., Kim H.H., Kim H.J., Park J.G., Son K.Y., Jung J., Lee W.S., Cho K.O., Park S.J., Kang M.I. (2012) "Detection and molecular characterization of porcine type 3 orthoreoviruses circulating in South Korea." *Vet Microbiol*. 157, 456-63.

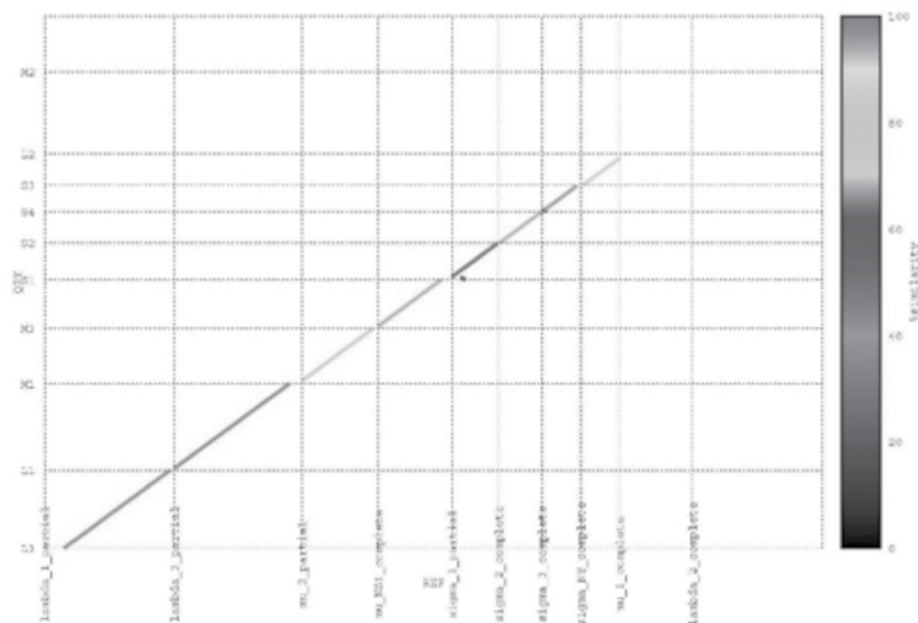


Figura 1. Confronto similarità tra MRV3 isolati in Italia da suino.

La figura riporta l'allineamento nucleotidico tra i diversi segmenti genici del genoma completo del ceppo lombardo (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016, in ascissa) e quello del ceppo veneto (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015, in ordinata). I colori indicano la percentuale di similarità di sequenza tra le diverse porzioni allineate in accordo alla scala cromatica a destra. L'allineamento nucleotidico è stato eseguito con MUMmer.

Figure 1. Comparison of similarity between MRV3 isolated in Italy from swine.

The figure shows the nucleotide alignment between the different genes of the complete genome of the strain from Lombardia region (MRV3 / swine / Italy / 16DIAPD52154 / 2016, on abscissa) and from strain from Veneto region (MRV3 / swine / Italy / 224660-4 / 2015, in the ordinate). The colors indicate the percentage of sequence similarity between the different portions aligned according to the chromatic scale on the right. The nucleotide alignment is done with MUMmer.

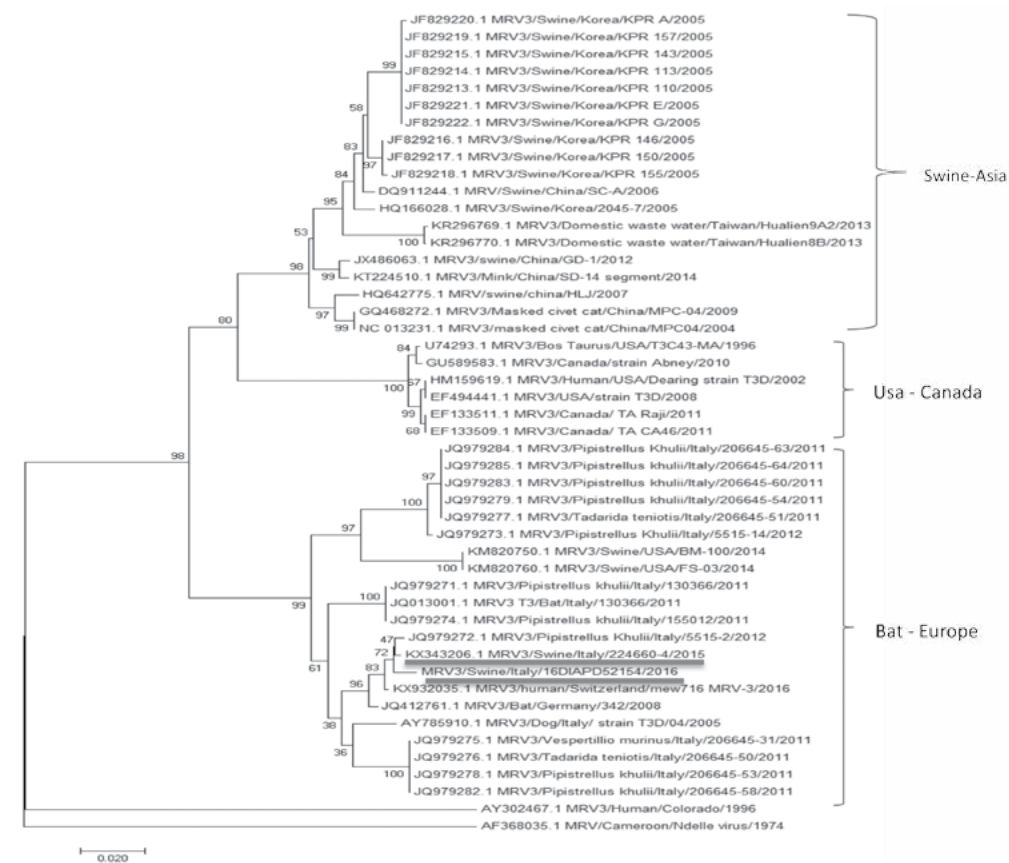


Figura 2. Albero filogenetico delle sequenze nucleotidiche del gene S1 dei ceppi MRV3. Albero filogenetico del segmento genico S1 costruito mediante Neighbor-joining, analisi di bootstrap da 1000 repliche e Maximum Likelihood come modello di sostituzione nucleotidica. Per la costruzione dell'albero sono state utilizzate solo sequenze di MRV di tipo 3. In rosso sono evidenziati i due ceppi italiani, quello Veneto (MRV3/swine/Italy/16DIAPD52154/2016) e quello Lombardo (MRV3/swine/Italy/224660-4/2015).

Figure 2. Phylogenetic tree of nucleotide sequences of MRV3 S1 gene.

Phylogenetic tree of the S1 gene segment built by Neighbor-join method, bootstrap analysis of 1000 replicates and Maximum Likelihood as a nucleotide substitution model. For tree construction were used only sequences of MRV type 3. The two Italian strains are highlighted in red, the one from Veneto region (MRV3 / swine / Italy / 16DIAPD52154 / 2016) and the one from Lombardia region (MRV3 / swine / Italy / 224660 -4 / 2015).

**VALUTAZIONE DEL RAPPORTO COSTO/BENEFICIO NELLA
PRODUZIONE DEL SUINO PESANTE ITALIANO A SEGUITO DI
UN PROGRAMMA VACCINALE ONE SHOT (CON HYOGEN®)
VS LA POLMONITE ENZOOTICA SUINA.**

**COST/BENEFIT EVALUATION IN ITALIAN HEAVY PIGS PRO-
DUCTION AFTER A ONE SHOT VACCINATION (WITH HYO-
GEN®) VS SWINE ENZOOTIC PNEUMONIAE**

¹FACCENDA M., ROSINA S. ², CASAPPA P. ², COMINOTTI F. ², KREJCI R. ³,
LISGARA M. ⁴, MAZEROLLES P. ³

¹ *Libero Professionista - Piemonte*, ² *Ceva Salute Animale*, ³ *Ceva Santé Animale*, ⁴ *Ceva Hellas*

Parole chiave: suino pesante, polmonite enzootica, programma vaccinale

Key words: heavy pigs, enzootic pneumoniae, vaccination program

Riassunto: La Polmonite Enzootica Suina (PE) è una delle principali problematiche dell'allevamento industriale; ciò sia per la capacità di *M. hyopneumoniae* (suo agente eziologico) di determinare importanti danni economici negli allevamenti colpiti, sia per la capacità dello stesso di favorire l'irruzione di germi secondari in grado di complicare ulteriormente il quadro clinico (1).

Da ormai molti anni, la profilassi vaccinale è strumento d'elezione nel controllo del patogeno e della sua diffusione. Il presente studio ha valutato l'impatto della applicazione di una vaccinazione One Shot con Hyogen® in un allevamento industriale del Nord Italia, paragonandola ad un programma dotato di vaccinazione di richiamo su due gruppi distinti rispettivamente di 5.867 (gruppo A) e di 8.870 (gruppo B) suini all'ingrasso. I parametri considerati e paragonati sono stati: la percentuale di morti e scarti, l'utilizzo di chemioterapici verso la patologia respiratoria e l'Indice di Conversione Alimentare. La percentuale di soggetti morti o scartati durante il periodo di prova è stata del 4,75% nel gruppo A vs il 5,14% del gruppo B ($p = <0,05$), il costo medicazione è stato di 3,49€/soggetto nel gruppo A vs 4,93€ nel gruppo B ($p = <0,05$) e l'Indice di Conversione Alimentare è stato di 0,104 punti migliore nel gruppo A rispetto al gruppo B. Tali dati indicano che il programma One Shot, nell'azienda considerata ha originato performance migliorative rispetto al programma vaccinale utilizzato in precedenza.

Summary: Swine Enzoootic Pneumoniae (EP) is one of the most relevant problems faced by swine industrial production; this is due to *M. hyopneumoniae* characteristic to produce consistent economical damages in infected herds and to its "door opener" effect, promoting infections induced by other pathogens.

Since many years vaccination is the first choice to control the pathogen and its circulation in the herds. This study evaluated the application of a single shot program vaccination (Hyogen® - group A) versus a double shot vaccination program (group B), applied in an industrial pig farm, located in North Italy. Group A consistency was for 5.867 pigs vs 8,870 pigs in group B. Considered parameters included: percentage of dead or culled pigs, medication costs and Conversion Index for both groups. The results showed that group A had better performances: 4,75% of dead or culled pigs vs 5,14% ($p = <0,05$), lower medication costs (3,49€/head vs 4,93€/head – $p = <0,05$) and also a better Conversion Index (-0,104 in group A – $p = >0,05$).

INTRODUZIONE

La polmonite enzootica suina (PE) è una delle principali patologie che affliggono il sistema respiratorio a detrimento delle condizioni di salute degli animali e delle performance zoeconomiche delle aziende suinicole. Negli ultimi anni sono stati condotti studi relativi alla patogenicità di *M. hyopneumoniae*, agente eziologico della patologia, volti a chiarire il diverso comportamento dell'infezione nei soggetti colpiti e, più specificamente, a chiarire se vi fossero ceppi di *Mycoplasma* dotati di maggiore patogenicità rispetto ad altri (2,3)

La vaccinazione vs *M. hyopneumoniae* ha dimostrato nel tempo di essere in grado di controllare la patologia. Nel caso dell'efficienza zootecnica dei soggetti colpiti, soprattutto in relazione all'entità e alla estensione delle lesioni polmonari indotte dal patogeno (4,5,6) è stato di grande aiuto l'inserimento della valutazione degli score polmonari al macello: questa metodica, sviluppata da Dottori et al. (7,8) in Italia è oggi routinaria e consente di stabilire una corretta correlazione tra gli esiti dell'esame polmonare e le performance del gruppo analizzato. In questo modo è possibile verificare l'efficienza ed il corretto posizionamento temporale del programma vaccinale scelto.

Un cenno a parte merita poi l'aumento dei costi per le medicazioni. Nel contesto attuale, controllare un patogeno e grazie a questo poter utilizzare meglio l'antibiotico terapia è risultato di assoluto valore sia da un punto di vista economico per l'azienda, sia per evitare la creazione o l'aumento dei fenomeni di antibioticoresistenza sia per razionalizzare la chemioterapia stessa seguendo il percorso che le autorità sanitarie nazionali, europee e mondiali hanno intrapreso negli ultimi anni.

Scopo dello studio è stato, dunque, di valutare il benefit economico di un programma vaccinale One-Shot, eseguito con Hyogen, paragonato ad un programma a doppia vaccinazione, eseguito con il vaccino A, in un'azienda dedicata alla produzione del suino pesante italiano.

MATERIALI E METODI

Una azienda commerciale multi sito è stata selezionata per la prova. In totale 5.867 suini appartenenti a 9 bande diverse, sono stati sottoposti a vaccinazione con Hyogen® a 3 settimane di vita e 8.870 suini, appartenenti a 12 bande diverse sono stati invece vaccinati (Vaccino A) a 3 settimane di vita e sottoposti poi a richiamo (booster) a 5 mesi di vita, abbinando il trattamento alla vaccinazione di Aujeszky. Sono stati analizzati la percentuale di morti e scarti, la conversione alimentare ed il costo delle medicazioni utilizzate nel periodo comparando i risultati ottenuti dai diversi protocolli vaccinali. La valutazione economica finale è stata effettuata utilizzando Respinomics®, un programma di calcolo apposito per la valutazione delle performance economiche aziendali.

RISULTATI

La percentuale di soggetti all'ingrasso morti o scartati è stata inferiore per il gruppo sottoposto al programma vaccinale con Hyogen ($p < 0,05$) rispetto al gruppo vaccinato con Vaccino A (4,75% vs 5,14%). Il costo totale delle medicazioni per soggetto, includendo trattamenti iniettabili e per via orale, è stato di 3,49€/soggetto nel gruppo Hyogen e di 4,93€/soggetto nel gruppo trattato con il vaccino A ($p < 0,05$). L'Indice di Conversione Alimentare è stato inferiore nel gruppo Hyogen di 0,104 punti, paragonato all'altro gruppo. Sebbene la differenza non sia statisticamente significativa ($p > 0,05$) dal punto di vista economico questo è un ulteriore elemento di interesse. Il benefit legato a minore mortalità, minore costo di medicazione e migliore indice di conversione per ciascuna delle bande vaccinate con Hyogen è risultato essere pari a 4,08€ per suino trattato.

CONCLUSIONI

Nel presente studio, un trattamento One Shot con Hyogen ha determinato una migliore efficienza economica nei soggetti trattati grazie ad un calo di mortalità e soggetti di scarto ad un calo del costo medicazione e ad un miglioramento dell'indice di conversione se paragonati ai medesimi dati ottenuti da soggetti sottoposti ad un programma vaccinale a doppia dose, ancora di uso comune nella realtà dell'allevamento suinicolo Italiano.

BIBLIOGRAFIA:

1. Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor DJ, eds. Diseases of Swine. 8th ed. Ames, Iowa: Iowa University Press; (1999) :913-940.
2. Maes D. et al, (2017) Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control; Transbound Emerg Dis.;1–15.
3. Michiels et al. (2017) Impact of diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* strains on lung lesions in slaughter pigs ; Vet Res 48 :2 DOI 10.1186
4. Straw BE¹, Tuovinen VK, Bigras-Poulin M.J Am Vet Med Assoc. (1989) Estimation of the cost of pneumonia in swine herds; Dec 15;195(12):1702-6.
5. Burch, D.G.S. (1982) ; The incidence and distribution of lung lesions associated with enzootic pneumonia in pigs from two farms and the effect of the extent of these lesions on weight gain ; proceedings IPVS Mexico city, Mexico pagina 95, 1982
6. David G S Burch (2007) ; Cost of Disease - Enzootic Pneumonia (Published in «Pig World» February 2007)
7. Meriardi G., Bonilauri P., Dottori M., Nigrelli A., Martelli P., (2008). Monitoring respiratory disease at slaughterhouse using lung and pleural lesions score and serology. Proceedings of the 20th IPVS Congress, Durban, South Africa, June 22-27, 2008; vol. 2: p. 380.
8. Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Sala V., (2007). Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. Journal of veterinary medicine, 5, 70-75.

ABOLIRE IL TAGLIO DELLA CODA NEL SUINO: EFFETTO DELLA PAGLIA COME ARRICCHIMENTO AMBIENTALE SUL CONTROLLO DELLA MORSICATURA E SULLE PERFORMANCE ZOOTECHNICHE IN SUINETTI ALLO SVEZZAMENTO

BAN ON TAIL DOCKING IN PIGS: THE EFFECT OF STRAW AS AN ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ON THE CONTROL OF THE BITING AND ON THE ZOOTECHNICAL PERFORMANCES IN WEANING PIGLETS

GALLI M.C.¹ , SCOLLO A.² , CONTIERO B.³ , GOTTARDO F.³

¹Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali, Università degli studi di Perugia; ²Libero professionista *Suivet*; ³Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova

Parole chiave: suini, arricchimento ambientale, paglia, taglio della coda, performance

Key Words: pigs, environmental enrichment, straw, tail docking, performance

Riassunto: Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare se la presenza di una quantità modesta di paglia sia in grado di ridurre in modo significativo il comportamento di morsicatura delle code, senza che però l'ingestione determini degli effetti negativi sulle performance di crescita nel mese successivo lo svezzamento. Si è voluto, infine, valutare se l'ingestione di paglia potesse avere degli effetti positivi quale fonte di fibra in grado di ridurre l'incidenza della diarrea post-svezzamento, misurata tramite valutazione della consistenza delle feci presenti nel box. Per la prova sono stati utilizzati 560 suinetti appena svezzati ai quali non era stato effettuato il taglio della coda, suddivisi in due trattamenti: il gruppo controllo prevedeva box dotati di una catena, un tronchetto di legno sospeso e un cesto tubulare vuoto agganciato al soffitto e pendente al centro del box; nel gruppo paglia invece i box erano dotati degli stessi arricchimenti ambientali ma il cesto veniva regolarmente riempito con della paglia tagliata lunga. Tra questi ne sono stati selezionati e osservati individualmente 40 per ciascun trattamento. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza che nel primo mese post-svezzamento l'ingestione di una quantità modesta di paglia (7g/capo/giorno) è in grado di diminuire la presenza e la gravità delle lesioni alla coda senza però incidere sulle performance di crescita. L'ingestione di paglia non ha però mostrato effetti significativi sulla consistenza delle feci presenti nel box.

Abstract: The aim of this study was to evaluate if the presence of a small amount of straw, is able to reduce significantly tail biting, without compromising growth performance in the first month after weaning. Finally, it was evaluate if straw ingestion could have a positive effect as a source of fiber able to reduce the incidence of post-weaning diarrhea, measured by evaluating stools consistency in the pen. To this end, 560 undocked weaned piglets were considered. Among these, 40 piglets (10 per pen) for each treatments were selected and observed. The first treatment included pens with metal chain, suspended wooden log and a metal basket hanging in the pen, while in the second treatment the pens included the same environmental enrichment but the metal basket was regularly filled with long straw. The results obtained showed that the ingestion of a modest amount of straw (7g/day/pig) in the first month post-weaning is able to decrease the presence and the severity of tail's lesion without affecting growth performance. However, the ingestion of straw has not shown significant effect on stools consistency in the pen.

INTRODUZIONE

I suini sono animali onnivori che in natura vivono e si spostano in un ampio spazio, trascorrendo più della metà del tempo alla ricerca del cibo, grufolando e pascolando, con lunghe camminate per esplorare l'ambiente e brevi periodi di riposo. Esplorare è un bisogno importante per il suino ed è un comportamento con un'elevata motivazione e differenti obiettivi quali: la ricerca di cibo, la ricerca di un luogo confortevole per riposare, la raccolta di informazioni sull'ambiente circostante (Barbieri e Canali, 2012). L'ambiente monotono e privo di stimoli delle porcilaie, tuttavia, non garantisce la possibilità di manifestare tale comportamento e questa condizione rappresenta uno dei maggiori problemi di benessere animale ed è indicata come la principale causa della comparsa di comportamenti anomali e potenzialmente pericolosi, quali la morsicatura della coda (Barberi e Canali, 2012). Nella maggior parte dei Paesi Europei la misura preventiva più utilizzata per evitare la morsicatura della coda è rappresentata dal taglio della coda (EFSA, 2007). Questa pratica, oltre ad essere dolorosa per gli animali, è correlata alla presenza in allevamento di problemi cronici di benessere animale, quali privazione comportamentale e noia. Mossa dalla consapevolezza di tali problematiche e dalla crescente attenzione da parte dei consumatori verso il benessere animale, i quali considerano questa tematica una priorità nella produzione zootecnica (EU Commission, 2007), l'Unione europea ha emesso una Direttiva (Direttiva 2008/120 CE) che impone agli allevatori l'utilizzo di materiali che permettano ai suini di esprimere il proprio comportamento esplorativo e vieta il taglio della coda come procedura di routine. Nonostante questa legislazione e numerosi studi che dimostrano come l'arricchimento ambientale, in particolare la fornitura di paglia, sia in grado di ridurre la morsicatura della coda e il comportamento aggressivo (EFSA, 2007), la maggior parte degli allevamenti europei, a causa dell'utilizzo di una pavimentazione fessurata e di un sistema di allontanamento delle deiezioni che facilmente si ostruirebbe con la paglia, continua ad effettuare in maniera sistematica il taglio della coda come mezzo di prevenzione ed utilizzano altri arricchimenti ambientali, quali catene, corde, oggetti di plastica e tronchetti in legno fissati a catene, i quali però non forniscono un'opportunità per la masticazione distruggibile e per l'esplorazione, presentandosi quindi come una fonte di arricchimento di efficacia non ottimale (Zonderland, 2007; Bracke, 2005). Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare l'efficacia dell'utilizzo, nella fase di svezzamento, della paglia, presentata in modesta quantità all'interno di cesti tubulari in metallo agganciati al soffitto e pendenti al centro del box, quale arricchimento ambientale volto a prevenire il comportamento di morsicatura della coda rediretto verso i compagni di box. Si è voluto quindi valutare se l'ingestione di paglia in questa fase delicata dell'allevamento potesse influire sull'incremento ponderale e sull'indice di conversione alimentare, e infine se, quale fonte di fibra in grado di influire sulle proprietà fisicochimiche del digesta, sulla morfologia e sulla microflora del tratto gastrointestinale e sulla maturazione e l'integrità della mucosa intestinale (Molist, 2009), potesse ridurre l'incidenza della diarrea post-svezzamento, valutata mediante osservazioni della consistenza fecale.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata svolta presso un allevamento suinicolo della Pianura Padana che si occupa dell'allevamento dei suinetti nelle dieci settimane post-svezzamento e della successiva fase di magronaggio e ingrasso. Per la prova sono stati utilizzati 560 suinetti appena svezzati (28 giorni di età), appartenenti alla stessa banda, con provenienza, data di svezzamento e genetica (ibridi commerciali) comune a tutti i soggetti. A nessun suinetto era stata effettuata la caudectomia e quindi presentavano la coda in tutta la sua lunghezza. Gli animali sono stati stabulati nella medesima struttura, in modo da garantire condizioni ambientali simili ai diversi gruppi, questi ultimi composti da suinetti con un peso iniziale omogeneo. Gli animali

sono stati distribuiti in due sale identiche tra loro, ognuna delle quali destinata ad un gruppo sperimentale. All'interno di ciascuna sala erano presenti 4 box da 70 suinetti ciascuno: nei 4 box CONTROLLO erano presenti, in ciascun box, una catena sospesa, un tronchetto di legno e un cesto tubulare agganciato al soffitto e pendente al centro del box, entrambi sospesi a delle catene; nei 4 box SPERIMENTALI, erano presenti, in ciascun box, gli stessi arricchimenti presenti nel gruppo controllo ma in cui il cesto tubulare di metallo appeso alla catena veniva riempito con 500 g di paglia tagliata lunga a giorni alterni per i primi 7 giorni e giornalmente per il resto della sperimentazione, in base al consumo degli animali, facendo attenzione a non lasciare mai gli animali senza arricchimento. Per le misurazioni dell'incremento ponderale, dell'indice di conversione alimentare e delle lesioni alla coda sono stati selezionati, in maniera casuale, 10 suinetti per ciascun box, in modo da ottenere una rappresentatività di 40 suinetti per trattamento. Ai suini scelti casualmente è stata applicata una marca auricolare in cui è stato segnato un numero identificativo univoco, in modo da poterli riconoscere ed indentificare. Al fine di evitare problemi ai sistemi di evacuazione delle deiezioni, che si sarebbero venuti a creare se la paglia fosse caduta, attraverso le fessure della pavimentazione, nelle fosse sottostanti, si è provveduto a posizione dei tappetini di plastica al di sotto del cesto tubulare contenente la paglia. Con questa soluzione, oltre a far fronte ai problemi di otturazione delle tubazioni, i suinetti avevano la possibilità di "giocare", "manipolare", masticare e ingerire la paglia, che altrimenti sarebbe finita nelle fosse sottostanti.

La prova ha avuto durata di 28 giorni durante la quale sono stati registrati settimanalmente il peso individuale dei suinetti, le lesioni alla coda e il "diarrea score" del box. Le lesioni alla coda sono state valutate attraverso un sistema di punteggio in una scala da 0 a 2. Il punteggio 0 è stato attribuito a quelle code che non presentavano alcun tipo di lesione, 1 per quelle che presentavano lesioni lievi con perdita di pelo, arrossamenti, irritazioni, graffi o piccole abrasioni, 2 per lesioni gravi con perdita di tessuto. La consistenza della feci all'interno del box è stata annotata attraverso un sistema di punteggio in una scala da 0 a 3. Per ogni osservazione è stato considerato ogni punto del box in cui i suini defecavano, registrandone il punteggio più rappresentativo in quello spazio. Il punteggio 0 è riferito a feci con consistenza di pellet, 1 per feci semi-pellet, 2 morbide e 3 acquose. La quantità di alimento somministrata ad ogni box è stata invece registrata giornalmente. Registrando settimanalmente il peso individuale dei suinetti e giornalmente la quantità di alimento somministrato è stato possibile calcolare l'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG) e l'indice di conversione alimentare (ICA). Per l'analisi dei dati relativi alle variabili "incremento ponderale medio giornaliero" e "indice di conversione alimentare" sono state effettuate mediante modello ANOVA con il trattamento (senza paglia vs con paglia) come fattore fisso. Relativamente alle variabili "lesioni della coda" e "consistenza fecale" è stata utilizzato il test non parametrico di Mann-Whitney.

RISULTATI

Nella Tabella 1. sono riportati gli effetti dell'ingestione della paglia presentata all'interno del cesto tubulare sulle performance di crescita. Le variabili sono state analizzate sia nella singola settimana di osservazione (prima, seconda, terza e quarta settimana post-svezzamento) che nell'intero periodo di riferimento (l'intero mese successivo allo svezzamento). Dall'analisi statistica dei dati emerge che la fornitura di circa 7g di paglia al giorno per capo non determina nessuna differenza significativa né sull'incremento ponderale giornaliero né sull'indice di conversione alimentare, nei singoli timing di rilevazione e nell'intero periodo.

	SENZA PAGLIA	CON PAGLIA	SE	P TRATTAMENTO
IPMG 1° settimana post-svezzamento (kg/d/capo)	0,002	0,054	0,047	0,464
IPMG 2° settimana	0,18	0,187	0,02	0,791
IPMG 3° settimana	0,314	0,294	0,008	0,111
IPMG 4° settimana	0,394	0,447	0,026	0,203
IPMG intero periodo	0,24	0,265	0,018	0,366
ICA 1° settimana (kg/kg)	-0,55	0,43	1,17	0,56
ICA 2° settimana	2,54	2,04	0,35	0,35
ICA 3° settimana	2,62	3,1	0,15	0,07
ICA 4° settimana	2,87	2,83	0,24	0,91
ICA intero periodo	2,85	2,75	0,239	0,775

Tabella 1. Effetto dell’ingestione di paglia sulle performance di crescita
Table 1. Effect of straw ingestion on growth performance

Nel Grafico 1. viene riportata, per ciascun trattamento, la variazione nel tempo della percentuale di suini che hanno presentato almeno una lesione. Dal grafico appare chiaro come questa percentuale vari nel tempo in maniera differente a seconda della presenza o meno di paglia quale arricchimento ambientale, e che questa differenza risulti sempre più evidente con l’avanzare del tempo.

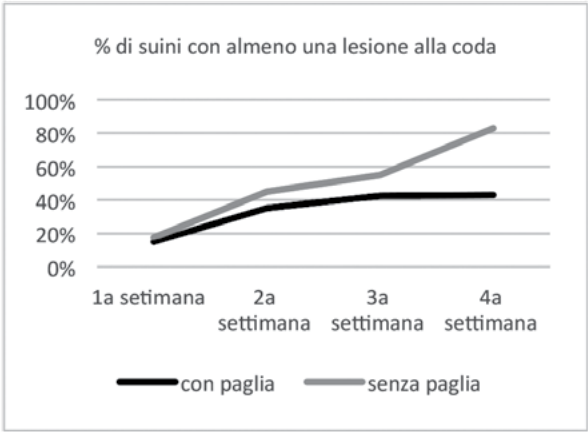


Grafico 1. Effetto della paglia sulla variazione della percentuale di suini con lesioni alla coda
Graphic 1. Effect of straw on the percentage of pigs with tail's lesions

Abbiamo voluto quindi analizzare dettagliatamente il diverso grado di lesioni alla coda riportate dai suinetti nei vari periodi di osservazione, calcolando per ciascun trattamento la percentuale di animali che presentavo score 0, score 1 e score 2 e mettendole a confronto. Da come emerge dai Grafici 2 e 3, nelle prime due settimane successive lo svezzamento la presenza di paglia non ha determinato alcuna differenza significativa sulla gravità delle lesioni alla coda.

Nella terza settimana di svezzamento è emersa invece una differenza significativa tra i trattamenti nella percentuale di suini che presentavano le lesioni più gravi (Grafico 4.): lo score 2 è stato infatti registrato nel 10% dei suini stabulati nei box in cui era presente paglia e nel 33% dei suini stabulati in box privi di questo arricchimento ambientale ($P<0,01$).



Grafico 2. Percentuale di suini con lesioni alla coda per score nella 1° settimana post-svezzamento.

Graphic 2. Percentage of pigs with tails 'lesion by score in the 1st week post weaning.



Grafico 3. Percentuale di suini con lesioni alla coda per score nella 2° settimana post-svezzamento.

Graphic 3. Percentage of pigs with tails 'lesion by score in the 2nd week post weaning.



Grafico 4. Percentuale di suini con lesioni alla coda per score nella 3° settimana post-svezzamento.

Graphic 4. Percentage of pigs with tails 'lesion by score in the 3rd week post weaning.

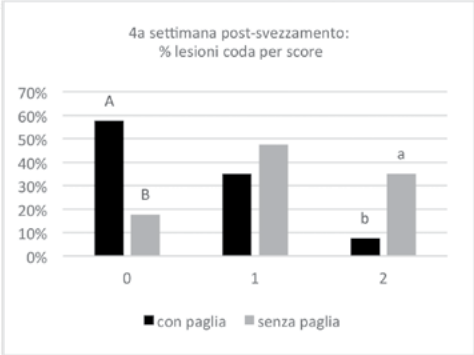


Grafico 5. Percentuale di suini con lesioni alla coda per score nella 4° settimana post-svezzamento.

Graphic 5. Percentage of pigs with tails 'lesion by score in the 4th week post weaning.

Nella quarta settimana successiva lo svezzamento la presenza di paglia ha fatto emergere altre differenze significative sul grado di lesioni presenti sulla coda dei suini (Grafico 5.): la coda priva di qualsiasi segno di lesione (score 0) è stata registrata nel 58% dei suini stabulati nei box in cui era fornita paglia, e solo nel 18% dei suini stabulati nei box in cui era assente questo arricchimento ambientale ($P<0,001$); code con segni gravi di lesioni e perdita di tessuto (score 2) sono state registrate solo nell'8% dei suini osservati all'interno dei box arricchiti con la paglia e nel 35% dei suini osservati nei box privi di paglia ($P<0,01$).

Per quanto riguarda la percentuale di osservazioni che si sono registrate per ciascuno score riguardante la consistenza delle feci presenti nei box, mettendo a confronto le percentuali per i vari score nei due trattamenti non sono emerse differenze statisticamente significative, anche se feci acquose sono state registrate nel 61% delle osservazioni in box dove i suini non avevano disponibilità di paglia e nel 44% delle osservazioni in box con la paglia.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio concordano con studi precedenti (Beattie, 2000; Beattie, 1995) nel confermare che la fornitura di paglia razionata nelle 4 settimane successive lo svezzamento non ha effetti sulle performance produttive dei suinetti. L'ingestione di paglia in questa fase infatti non influisce negativamente sull'incremento ponderale e sull'indice di conversione alimentare e può quindi essere fornita non inficiando sulla produttività degli animali. Questo risultato è di primaria importanza in quanto problemi di ridotta crescita in questo periodo estremamente difficile e delicato nella vita dei suinetti causerebbero serie implicazioni sulla salute e la redditività dell'allevamento, rendendo complicato l'utilizzo di questo arricchimento ambientale. È interessante notare che la presenza di paglia quale arricchimento ambientale ha mostrato i suoi effetti nel ridurre in maniera significativa la quantità e soprattutto la gravità delle lesioni dovute alla morsicatura della coda, ma che questo comportamento anomalo, sintomo che gli animali vivono in un ambiente inadeguato e privo di stimoli, non ha avuto ripercussioni negative sulle performance di crescita. Tuttavia, nello studio di Beattie et al. (2000), in cui le performance produttive sono state registrate anche nella fase successiva allo svezzamento, è emerso che nell'ultimo periodo di osservazioni (dalla quindicesima alla ventunesima settimana) i suini stabulati in box in cui era presente la paglia presentavano un maggiore incremento ponderale giornaliero, e un miglior indice di conversione alimentare a partire già dall'ottava settimana. Il fatto che i tassi di crescita più bassi si siano presentati nei box privi di arricchimenti ambientali durante la fase successiva di allevamento e non durante il periodo post-svezzamento potrebbe riflettere un effetto cumulativo dell'assenza di paglia sulle performance. Nel primo periodo l'ambiente monotono in cui vivono i suinetti sembra influire solo sulla manifestazione di comportamenti aggressivi, quali la morsicatura della coda, ma con il trascorrere del tempo, la noia e la frustrazione di non poter manifestare adeguatamente il comportamento esplorativo sembra determinare un alto livello di stress, che è stato dimostrato influire negativamente sull'efficienza della conversione alimentare (Barnett et al., 1983). Inoltre, nello stesso studio (Beattie, 2000), è emerso un significativo aumento di comportamenti aggressivi vicino alle mangiatoie dei box privi di arricchimenti, e ciò, molto probabilmente, ha influito nel determinare una minore ingestione alimentare registrata nell'ultimo periodo di osservazione.

I risultati ottenuti riguardanti l'effetto della paglia quale arricchimento ambientale in grado di ridurre l'incidenza e la gravità delle lesioni dovute alla morsicatura della coda rispecchiano a pieno quanto già evidenziato in studi precedenti (EFSA, 2007). Dalla presente ricerca è infatti emerso che la presenza di paglia, anche fornita in modeste quantità per evitare la possibilità di bloccare il sistema di allontanamento dei liquami, all'interno di un cesto tubulare in metallo, è in grado, a partire dalla terza settimana post-svezzamento, di ridurre in maniera

significativa la manifestazione e l'intensità del comportamento di morsicatura della coda. Il fatto che nelle prime due settimane le differenze tra i due trattamenti sia sulla presenza che sull'entità delle lesioni non siano risultate significative potrebbe essere legato alla presenza di denti ancora non del tutto sviluppati, ad una minore attività dei suinetti, che ancora devono adattarsi ed abituarsi al nuovo ambiente e ai cambiamenti successivi la fase di svezzamento, e alla presenza degli altri arricchimenti ambientali, che tuttavia in breve tempo fanno perdere interesse al suino. Dalla ricerca è infatti emerso che, dopo sole due settimane, gli altri oggetti presenti nel box, la catena e il tronchetto di legno sospeso, non risultano essere efficienti come la fornitura di paglia nel ridurre la manifestazione del comportamento di morsicatura della coda. Questa osservazione è in linea con quanto rilevato in studi precedenti (Zonderland, 2007; Van de Weered, 2006; Stubbe et al., 1999), i quali mettendo a confronto diversi tipi di arricchimenti ambientali hanno dimostrato che fornire la paglia è la soluzione più efficace per ridurre la comparsa di tali comportamenti anomali. La paglia infatti è il materiale che meglio soddisfa i bisogni comportamentali dei suini che hanno la possibilità di "manipolare", distruggere e ingerire, mantenendo alto il livello di occupazione.

L'ingestione di una quantità così modesta di paglia (7g/capo/giorno) non ha avuto però gli effetti sperati quale fonte di fibra in grado di influire sull'incidenza della diarrea post-svezzamento, almeno per il breve periodo considerato nella presente ricerca, ossia il primo mese post-svezzamento. Gli score che sono stati attribuiti alla consistenza delle feci presenti nei box non hanno infatti mostrato differenze significative a seconda della presenza o meno di paglia, anche se feci acquose sono state registrate nel 61% delle osservazioni in box dove i suini non avevano disponibilità di paglia e nel 44% delle osservazioni in box con la paglia. Visti precedenti studi che hanno dimostrato che includere nella dieta post-svezzamento polisaccaridi insolubili non amilacei (iNSP) rafforza il microbiota commensale nell'intestino (Högborg e Lindberg, 2006), determina una diminuzione dell'incidenza della colibacillosi post-svezzamento (Hanczakowska et al., 2008; Swiatkiewicz and Hanczakowska, 2006), una ridotta proliferazione di *E. coli* e *Clostridium spp.*, e un miglior rapporto tra altezza dei villi e profondità delle cripte (Swiatkiewicz and Hanczakowska, 2006), sarebbe interessante indagare se prendendo in considerazione un periodo più prolungato e effettuando ricerche più specifiche sullo sviluppo della microflora e sull'istologia intestinale si potessero ottenere dei risultati soddisfacenti che dimostrino che l'ingestione di paglia determina effetti positivi anche sulla salute degli animali.

BIBLIOGRAFIA

- Barbieri S., Canali E., (2012) "Benessere e produttività dell'allevamento suinicolo: uso dell'arricchimento ambientale". "Compatibilità ambientale e benessere animale nella filiera del suino per migliorare la redditività e garantire la sostenibilità-Filiera verde del suino".
- Barnett, J.L., Hemsworth, P.H., Hand, A.M., (1983). "Effects of chronic stress on some blood parameters in the pig". *Appl. Anim. Ethol.* 9, 273-277.
- Beattie, V.E., O'Connell, N.E., Moss B.W., (2000). "Influence of environmental enrichment on the behaviour, performance and meat quality of domestic pigs". *Livest. Prod. Sci.*, 65, 1-2, 71-79.
- Beattie, V.E., Walker, N., Sneddon, I.A., (1995). Effects of environmental enrichment on behaviour and productivity of growing pigs. *Anim. Welf.* 4, 207-220.
- Bracke, M.B.M., Zonderland, J.J., Lenskens, P., Schouten, W.G.P., Vermeer, H.M., Spoolder, H.A.M., Hendriks, H.J.M., Hopster, H., (2005). "Formalised review of environmental enrichment for pigs in relation to political decision making". *Appl. Anim. Behav. Sci.* 98, 165-182.
- EFSA, (2007) Scientific Report on the risk associated with tail biting in pigs and possible

means to reduce the need to tail docking considering the different housing and husbandry systems. The *EFSA Journal* 611:4-13.

EU COMMISSION, (2007). Attitudes of EU citizens towards animal welfare. Special Eurobarometer 270. Wave 66.1. TNS Opinion and Social.

Hanczakowska, E., Swiatkiewicz, M., Bialecka, A., (2008). "Pure cellulose as a feed supplement for piglets". *Med. Weter.* 64, 45-48.

Högberg, A., and J. E. Lindberg. (2006). "The effect of level and type of cereal non-starch polysaccharides on the performance, nutrient utilization and gut environment of pigs around weaning". *Anim. Feed Sci. Technol.* 127:200-219

Molist, F., A. Gómez de Segura, J. Gasa, R. G. Hermes, E. G. Manzanilla, M. Anguita, and J. F. Pérez. (2009). "Effects of dietary fibre on physicochemical characteristics of digesta, microbial activity and gut maturation in early weaned piglets". *Anim. Feed Sci. Technol.* 149:346-353.

Stubbe, A., Beck, J. and Jungbluth, T., (1999). "Improvement of animal welfare in intensive pig management systems by an activity displacement technique". *Landbauforschung Volkenrode, Sonderheft*, 193, 167-171.

Swiatkiewicz, M., Hanczakowska, E., (2006). "Effect of crude fibre concentrate supplementation on some characteristics of piglet intestine". *Polish J. Nat. Sci.* (Suppl. 3), 377-382.

Van De Weerd, H.A., Docking, C.M., Day, J.E.L., Breuer, K. and Edwards, S.A., (2006). "Effects of species relevant environmental enrichment on the behaviour and productivity of finishing pigs". *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 99, 230-247.

Zonderland, J.J., Wolthuis-Fillerup, M., van Reenen, C.G., Bracke, M.B.M., Kemp, B., den Hartog, L.A., Spoolder, H.A.M., (2007). "Prevention and treatment of tail biting in weaned piglets". *Appl. Anim. Behav. Sci.* 110, 269-281.

LESIONI IATROGENE NELLE COPPE DI SUINI: DESCRIZIONE DI UN EPISODIO

IATROGENIC LESIONS IN THE NECK OF PIGS: A CASE REPORT

MARRUCHELLA G., ODINTZOV VAINTRUB M., VIGNOLA G.

Università di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Località Piano d'Accio, 64100, Teramo, Italia

Parole chiave: suino, coppa, lesioni iatrogene

Key words: pig, neck, iatrogenic lesions

Riassunto: Le lesioni iatrogene della muscolatura possono impattare negativamente sul valore dei tagli più pregiati delle carcasse suine. Si descrive un episodio, recentemente verificatosi in centro Italia, nel corso del quale oltre il 60% delle coppe ha mostrato alterazioni riferibili alla somministrazione parenterale di farmaci. Le caratteristiche macroscopiche e microscopiche delle lesioni hanno consentito di risolvere piuttosto facilmente il quesito diagnostico. Molti i fattori potenzialmente all'origine del problema. L'analisi di tali fattori non può prescindere dalla piena collaborazione di tutte le figure professionali coinvolte; da ciò dipende il successo degli interventi correttivi messi in atto.

Abstract: Iatrogenic muscle lesions can have a negative impact on the value of pig carcasses. We describe herein an outbreak of iatrogenic lesions, which recently occurred in central Italy. Over 60% of the necks showed lesions due to parenteral administration of drugs. The gross and microscopic features of lesions allowed us to solve the diagnostic query. Many factors had potentially contributed to the development of this issue. The proper analysis of these factors, as well as the success of the corrective actions, require the total collaboration of different professional figures.

INTRODUZIONE

Il comparto suinicolo italiano è quasi totalmente orientato alla produzione del suino "pesante", le cui carni sono destinate all'industria di trasformazione per la produzione di salumi. Ne deriva che la gran parte del valore commerciale delle carcasse suine risiede nei tagli pregiati (prosciutti *in primis*, coppa, spalle). Le patologie muscolari del suino sono, nel loro complesso, relativamente rare e di impatto economico marginale, soprattutto da quando si attua la profilassi genetica della "porcine stress syndrome" (Sims, 1996; Konradt et al., in press). Fanno eccezione le lesioni muscolari (ascessi, granulomi) conseguenti alla somministrazione di farmaci e vaccini, che solitamente interessano la muscolatura del collo e si rendono visibili al macello e al momento del sezionamento delle coppe. Le lesioni iatrogene possono assumere carattere "epidemico", compromettendo la redditività dell'intera filiera (Rasmussen et al., 1976; Valtulini et al., 2005). Il presente contributo ha l'obiettivo di descrivere le principali caratteristiche di un episodio, verificatosi di recente in una piccola realtà aziendale del centro Italia, nel corso del quale le lesioni della muscolatura del collo sono state particolarmente gravi per frequenza e estensione.

MATERIALI E METODI

Il problema ha interessato una filiera produttiva costituita da un allevamento a ciclo chiuso di medie dimensioni, con annesso macello e stabilimento di trasformazione e stagionatura. I suini

allevati erano ibridi commerciali, portati a pesi di macellazione piuttosto elevati (>170 Kg). I suini venivano vaccinati esclusivamente nei confronti della malattia di *Aujeszky*, utilizzando un vaccino vivo attenuato (eccipienti = mercuriotiolato sodico ed olio leggero di paraffina). Vengono di seguito riportati gli altri farmaci somministrati per via parenterale, tutti autorizzati all'uso nella specie suina:

- ferro destrano 100 mg/ml (eccipiente = fenolo);
- desametasone 2 mg/ml (eccipienti = E219, E223, E217);
- lincomicina cloridrato 56.7 mg/ml + spectinomicina cloridrato 150 mg/ml (eccipienti = E1519, E223);
- enrofloxacin 100 mg/ml (eccipienti = E1519).

Le lesioni a carico delle coppe, fino ad alcuni mesi prima assolutamente sporadiche, sono aumentate in modo esponenziale, fino ad interessare oltre il 60% dei suini macellati, in forma mono o bilaterale e più o meno estesa. Nessuna lesione simile è stata mai osservata a livello degli altri tagli (prosciutti, spalle, lonze). L'anamnesi non riferisce alcun cambiamento nei farmaci utilizzati, nelle modalità di somministrazione e nel personale addetto a svolgere questo compito.

Le coppe in questione sono state osservate da più medici veterinari c/o lo stabilimento di sezionamento e stagionatura. Campioni di tessuto sono stati prelevati da una decina di suini, fissati in formalina neutra tamponata al 10% e processati come di routine per gli approfondimenti istopatologici del caso (colorazione mediante ematossilina-eosina).

RISULTATI

Le lesioni muscolari erano di colore biancastro, fibrotiche, talvolta di aspetto lardaceo. La loro estensione era piuttosto variabile; tuttavia, non apparivano mai ben circoscritte ma tendevano ad insinuarsi fra i fasci muscolari, raggiungendo nei casi più gravi la regione sottoscapolare. Talvolta, l'aspetto più evidente era la perdita di fibre muscolari, sostituite da tessuto connettivo adiposo (Figura 1).

Istologicamente, le lesioni erano principalmente caratterizzate dalla proliferazione di tessuto connettivo fibroso, che in alcuni casi conteneva residui di materiale amorfo. Pure evidenti processi regressivi e rigenerativi delle fibre muscolari. Occasionalmente si notava la presenza di microgranulomi, raramente caratterizzati dalla presenza di cellule multinucleate.

L'analisi complessiva dei dati anamnestici ed anatomo-istopatologici induce a ritenere assolutamente verosimile la natura iatrogena delle lesioni muscolari osservate.

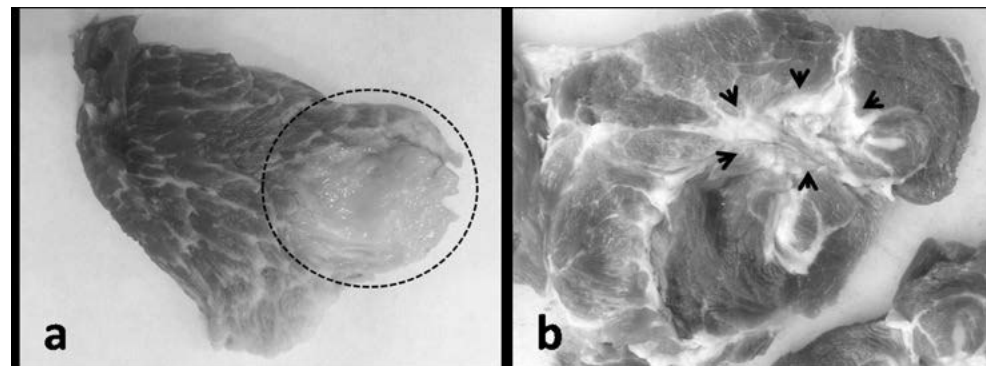


Figura 1. Suini. Muscoli del collo. Lesioni croniche d'aspetto lardaceo (a) o fibrotico (b).

Figure 1. Pigs. Muscles of the neck. Chronic lesion showing lardaceous (a) or fibrotic (b) appearance.

DISCUSSIONE

L'episodio descritto stimola alcune considerazioni di ordine generale. Innanzitutto, sebbene le caratteristiche fondamentali delle lesioni (sede, aspetto macroscopico e microscopico) consentano una rapida definizione del quesito diagnostico, si tende spesso a ricondurre la questione a cause poco o per nulla verosimili (genetiche, alimentari, tossicologiche etc.). Ciò, ovviamente, ritarda la presa di coscienza del problema e la sua efficace risoluzione. Inoltre, una volta stabilita la natura iatrogena delle lesioni, non è comunque semplice individuare il/i fattori che trasformano un evento sporadico in un problema di questa portata. Infatti, sono numerose le variabili potenzialmente coinvolte: volume di farmaco somministrato, frequenza di somministrazione, azione irritativa/necrotizzante dei principi attivi e/o degli eccipienti, eventuale miscelazione di farmaci, formazione del personale addetto alle terapie parenterali, corretto sito di inoculo, condizioni igieniche degli strumenti impiegati (siringhe, aghi) etc. L'analisi di tali fattori non può prescindere dalla piena collaborazione di tutte le figure professionali coinvolte; da ciò dipende l'efficacia degli interventi correttivi messi in atto.

CONCLUSIONI

La somministrazione parenterale di farmaci è pratica comune ma assolutamente non banale. L'uso corretto dei farmaci, la formazione del personale e le informazioni di ritorno dal macello/sezionamento sono fondamentali per individuare prontamente e risolvere eventuali "incidenti di percorso".

BIBLIOGRAFIA

- Konradt G., Cruz R.A.S., Bassuino D.M., Bianchi M.V., de Andrade C.P., da Silva F.S., Driemeier D., Pavarini S.P. (2017) "Granulomatous necrotizing myositis in swine affected by porcine circovirus disease". *Vet Pathol.*, in press.
- Rasmussen F., Svendsen O. (1976) "Tissue damage and concentration at the injection site after intramuscular injection of chemotherapeutics and vehicles in pigs". *Res Vet Sci.* 20(1), 55-60.
- Sims L.D. (1996) "Skeletal muscle" in: Sims L.D., Glastonbury J.R.W. "Pathology of the pig", 1a ed., Victoria (Australia), The Pig Research and Development Corporation, 277-286.
- Valtulini S., Macchi C., Ballanti P., Cherel Y., Laval A., Theaker J.M., Bak M., Ferretti E., Morvan H. (2005) "Aluminium hydroxide-induced granulomas in pigs". *Vaccine* 23(30), 3999-4004.

SISTEMA ALTERNATIVO PER LO *SCORE* DELLE PLEURITI NEI SUINI MACELLATI: INDAGINI PRELIMINARI

ALTERNATIVE SCORING METHOD OF PLEURISY IN SLAUGHTERED PIGS: PRELIMINARY INVESTIGATIONS

MARRUCHELLA G.,¹ ODINTZOV VAINTRUB M.,¹ DI PROVVIDO A.,¹ FARINA E.,¹ FRAGASSI G.,² VIGNOLA G.¹

¹Università di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Località Piano d'Accio, 64100, Teramo, Italia; Medico Veterinario, Libero Professionista

Parole chiave: suino, macello, pleuriti, metodi di punteggiatura

Key words: pig, slaughterhouse, pleurisy, scoring systems

Riassunto: Il macello è un punto di osservazione privilegiato per monitorare lo stato sanitario degli animali da reddito, la redditività del loro allevamento e l'efficacia delle strategie terapeutiche e/o profilattiche eventualmente messe in atto. Nel corso degli anni, sono stati messi a punto numerosi sistemi per quantificare le lesioni – soprattutto quelle a carico dell'apparato respiratorio - osservate in sede di macellazione. Fra questi, la griglia “*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*” (SPES) che trova ampio impiego per punteggiare le lesioni pleuriche riferibili a pleuropneumonia da *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Il presente studio si pone l'obiettivo di sviluppare e valutare un metodo alternativo per lo *score* delle pleuriti nei suini macellati, basato sull'ispezione della pleura parietale. Tale metodo è stato messo a confronto con la griglia SPES, individuata quale “*gold standard*” di riferimento in questo ambito. Le indagini fin qui svolte indicano che i due metodi forniscono risultati ampiamente sovrapponibili, con coefficienti di correlazione estremamente elevati. L'ispezione della pleura parietale e la punteggiatura delle lesioni eventualmente presenti si è dimostrata semplice e di rapida esecuzione, proponendosi come potenziale e valida alternativa al metodo SPES.

Abstract: Slaughterhouse is very useful in monitoring the health status of livestock, the profitability of their breeding and the effectiveness of the therapeutic and/or prophylactic strategies. Over the years, a number of methods have been developed to quantify the lesions - especially those affecting the respiratory tract - observed in slaughtered animals. Among these, the “*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*” (SPES), which is widely used to score the pleural lesions caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae*. The aim of the present study is to develop and assess an alternative method to score pleurisy in slaughtered pigs, based on the inspection of the parietal pleura. This method has been compared with the SPES grid, considered as the “*gold standard*” in this field of study. Preliminary data indicate that the two methods provide almost overlapping results, showing very high value of correlation coefficient. Scoring pleurisy on the parietal pleura proved to be fast and easy, and could represent a valuable alternative to the SPES method.

INTRODUZIONE

Il macello rappresenta un punto di osservazione estremamente utile per valutare lo stato sanitario degli animali da reddito, come pure l'efficacia degli interventi terapeutici e profilattici eventualmente intrapresi. Ciò vale in special modo per il suino: la sua breve vita produttiva non consente la piena guarigione delle lesioni che, pertanto, sono ancora ben evidenti alla visita ispettiva *post-mortem*. Nel corso degli anni, sono stati sviluppati diversi sistemi volti a quantificare l'impatto "economico" di malattie quali la rogna sarcotica, la rinite atrofica e l'ascaridiosi. Tuttavia, la massima attenzione è da sempre stata rivolta alle patologie che affliggono le basse vie respiratorie (polmonite da *Mycoplasma hyopneumoniae*, pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*) e che impattano notevolmente sulla redditività degli allevamenti suinicoli (Luppi et al., 2013; Scollo et al., 2017).

Indipendentemente dalla patologia presa in considerazione, il sistema di valutazione delle lesioni in sede di macellazione dovrebbe soddisfare specifici requisiti: a) dovrebbe essere semplice, rapido, compatibile con la velocità della linea di macellazione; b) dovrebbe essere facilmente standardizzabile e riproducibile; c) dovrebbe produrre dati facili da interpretare e da analizzare statisticamente (Luppi et al., 2013).

Le pleuriti sono piuttosto frequenti nella specie suina e di comune rilievo in sede ispettiva *post-mortem*. Nel tempo, sono stati sviluppati vari sistemi di "punteggiatura" delle pleuriti; fra questi, la griglia "*Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System*" (SPES; Dottori et al., 2007), che risponde adeguatamente ai criteri sopra citati e trova ampia diffusione per quantificare le lesioni conseguenti all'infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Luppi et al., 2013; Merialdi et al., 2012; Sibila et al., 2014).

Il presente studio si pone l'obiettivo di sviluppare e valutare un metodo alternativo per lo *score* delle pleuriti nei suini macellati, basato sull'ispezione della pleura parietale. Tale metodo è stato messo a confronto con il sistema SPES, individuato quale "*gold standard*" di riferimento in questo campo di indagine.

MATERIALI E METODI

Animali

Sono stati oggetto di studio in totale 216 suini, di 9-11 mesi di età e 140-180 Kg di peso vivo, regolarmente macellati nel periodo compreso fra novembre 2017 e gennaio 2018 in stabilimenti della provincia di Teramo (Italia).

Punteggiatura delle pleuriti

Lo *score* delle pleuriti è stato effettuato da tre medici veterinari, dopo un breve periodo di formazione durante il quale hanno condiviso le modalità di interpretazione ed espressione dei diversi quadri lesivi. Per ciascun suino, la presenza/assenza e la "gravità" della pleurite sono state valutate come di seguito riportato:

- i. un operatore si è posizionato dove viene usualmente effettuata l'ispezione dei visceri. Le reazioni infiammatorie della pleura viscerale (vale a dire il foglietto pleurico che riveste il parenchima polmonare) sono state riportate su un apposito format e quantificate secondo la griglia SPES (Dottori et al., 2007);
- ii. un secondo operatore si è posizionato in un punto successivo della catena di macellazione e ha ispezionato la pleura parietale (vale a dire il foglietto pleurico che riveste la parete toracica). L'eventuale presenza di pleuriti è stata riportata su un apposito format e quantificata come di seguito specificato. In breve, la pleura parietale è stata suddivisa in tre aree di facile identificazione: (a) dal 1° al 3° spazio

intercostale; (b) dal 4° al 6° spazio intercostale; (c) tutti i rimanenti spazi intercostali disposti caudalmente. In ciascuna di queste aree, la presenza di pleurite è stata punteggiata senza tener conto della sua estensione allo scopo di limitare, per quanto possibile, la soggettività del giudizio. In ossequio al sistema SPES, tenuto conto che le lesioni riferibili a pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae* solitamente coinvolgono i lobi diaframmatici, sono stati stabiliti i seguenti punteggi:

- pleurite a carico dei primi tre spazi intercostali = 1 punto
- pleurite a carico del 4°-6° spazio intercostale = 2 punti
- pleurite a carico degli spazi intercostali caudali = 3 punti

A ciascun suino è stato, quindi, attribuito uno *score* "totale", compreso fra 0 e 12 ed ottenuto sommando i punteggi di tutte le aree di entrambe le mezzene.

Il presente metodo di *score* verrà qui di seguito indicato con l'acronimo PEPP ("*Pleurisy Evaluation on Parietal Pleura*").

Analisi statistica

La numerosità del campione è stata determinata per un modello lineare generalizzato ed il calcolo effettuato utilizzando G*Power (Faul et al., 2007). La media dei punteggi ottenuti con i due metodi di *score* è stata confrontata in funzione dell'esito diagnostico (negativo o positivo) mediante analisi della varianza a una via. La relazione fra i punteggi ottenuti con i due metodi di *score* è stata valutata mediante il coefficiente di correlazione lineare di Pearson (*r*). La relazione funzionale tra le variabili misurate con i due metodi di *score* è stata risolta mediante analisi della regressione lineare, la cui significatività statistica è stata analizzata mediante analisi della varianza; la bontà del *fitting* è stata stimata mediante l'*R*².

RISULTATI

Score delle pleuriti con il metodo SPES

All'ispezione dei polmoni e della pleura viscerale, la presenza di pleurite è stata dimostrata in 109/216 suini (50,46%), mentre non è stata evidenziata alcuna infiammazione pleurica nei restanti 107/216 suini (49,53%). La distribuzione dei punteggi ottenuti con il metodo SPES è riportata nella Figura 1.

Score delle pleuriti con il metodo PEPP

L'ispezione della pleura parietale e lo *score* secondo il metodo PEPP hanno richiesto pochissimo tempo (5-10 sec/suino). La presenza di reazioni infiammatorie della pleura parietale è stata osservata in 108/216 suini (50%), mentre i restanti 108/216 suini (50%) sono stati considerati "sani" (Figura 2). La distribuzione dei punteggi ottenuti con il metodo PEPP è riportata nella Figura 1.

Analisi statistica

Il metodo PEPP si è dimostrato in grado di discriminare efficacemente i suini "patologici" da quelli "sani" ($p < 0.01$). L'analisi della correlazione dei risultati ottenuti con i due metodi di *score* dimostra un coefficiente di correlazione molto elevato ($r = 0.913$) e statisticamente significativo ($p < 0.01$). L'analisi della regressione lineare indica che il coefficiente di determinazione è molto elevato ($R^2 = 0.833$) e statisticamente significativo ($p < 0.0001$); la Figura 3 riporta graficamente l'analisi della regressione lineare e l'equazione della retta di regressione corrispondente fra i due sistemi.

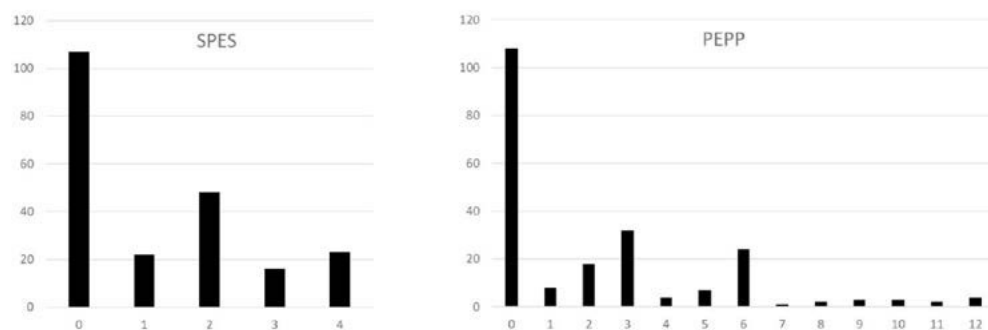


Figura 1. Rappresentazione grafica dei punteggi ottenuti applicando due diversi sistemi di valutazione delle pleuriti. Circa la metà dei suini esaminati non ha mostrato alcuna lesione pleurica ed ha pertanto ottenuto punteggio 0, con entrambi i metodi di *score*. La distribuzione degli *scores* ottenuti con il sistema SPES è stata piuttosto uniforme, con prevalenza del punteggio 2. Applicando il metodo PEPP, la gran parte dei suini con lesioni pleuriche è ricaduta nell'intervallo 1-6, con una “coda” di suini ai quali è stato attribuito un punteggio superiore a 7.

Figure 1. Graphical representation of the scores obtained by applying two different pleurisy evaluation systems. Approximately, the 50% of the pigs under study showed no pleural lesion and obtained score 0 using both scoring systems. The distribution of scores obtained by means of the SPES system was rather uniform, score 2 being more frequently recorded. By applying the PEPP method, most of the pigs with pleural lesions fell in the score interval 1-6, with a “tail” of pigs which scored >7.

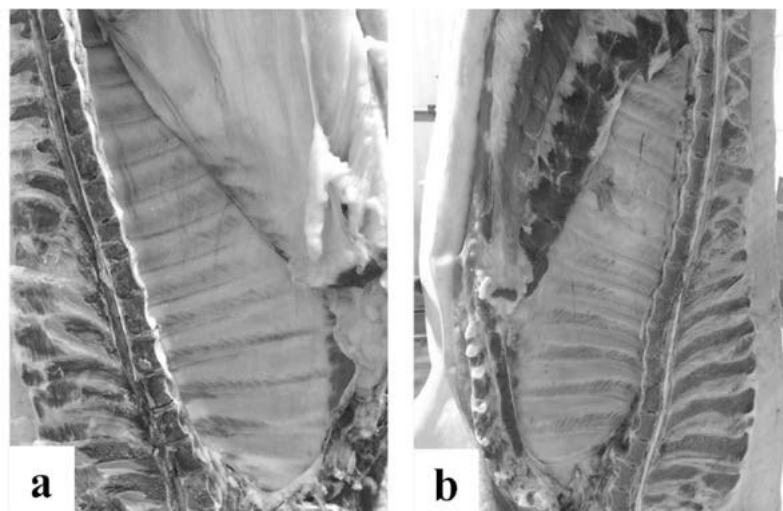


Figura 2. Ispezione della pleura parietale. L'immagine mostra l'aspetto normale della pleura parietale (a) e la presenza di un'ampia reazione infiammatoria, facilmente riconoscibile in corrispondenza degli ultimi spazi intercostali (b, punteggio 3).

Figure 2. Inspection of the parietal pleura. The pictures show the healthy appearance of the parietal pleura (a) and the presence of a large inflammatory reaction, easily recognizable at the level of the caudal last intercostal spaces (b, score 3).

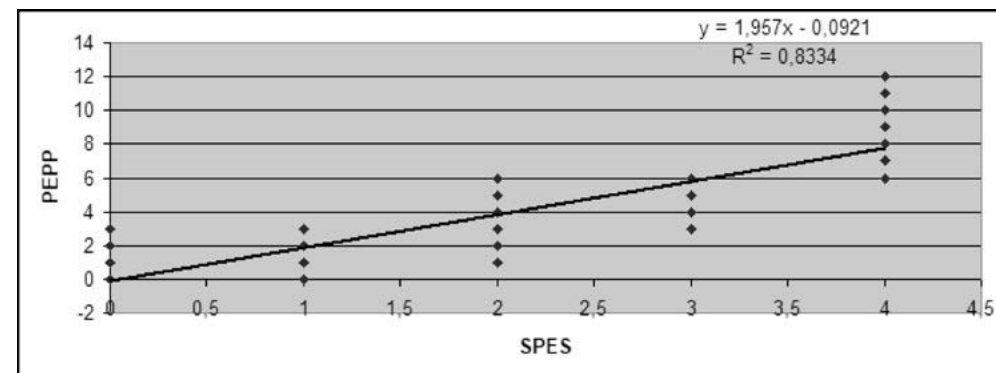


Figura 3. Analisi della regressione lineare ed equazione della retta di regressione corrispondente fra i sistemi di score SPES e PEPP.

Figure 3. Analysis of the linear regression and equation between the two scoring systems SPES and PEPP.

DISCUSSIONE

Considerata l'utilità del macello nelle attività di monitoraggio della suinicoltura e, più in generale, delle produzioni animali “moderne”, è sempre viva l'esigenza di nuovi metodi di valutazione, che meglio si adattino alle necessità specifiche di ciascun sistema produttivo. In tal senso, il metodo qui esposto si propone come una possibile alternativa al sistema SPES, i cui meriti sono stati nel tempo ampiamente documentati ed universalmente riconosciuti. Come atteso, i due metodi di *score* hanno fornito risultati sovrapponibili, con coefficienti di correlazione estremamente elevati. Infatti, salvo rare eccezioni (es. pleuriti di estensione limitata e circoscritte agli spazi interlobari), le pleuriti solitamente coinvolgono entrambi i foglietti (viscerale e parietale). A conferma di ciò la pressoché totale corrispondenza dei suini riconosciuti come “sani” (score 0) utilizzando i due diversi sistemi di valutazione. Di fatto, solo otto suini con aderenze interlobari non sono stati correttamente individuati quali “patologici” applicando il metodo PEPP; invece, sette suini con lesioni piccole e circoscritte ai primi spazi intercostali non sono stati identificati quali “patologici” applicando il metodo SPES.

Ovviamente il metodo PEPP, al pari degli altri, presenta pregi e difetti. Ad esempio, l'ispezione delle mezzene alla fine della catena di macellazione preclude all'operatore la possibilità di valutare contestualmente altre lesioni (es. polmoniti, pericarditi, epatiti parassitarie). Per contro, tale sistema consentirebbe all'operatore di compiere le sue valutazioni in un contesto più tranquillo e pulito, in un arco di tempo potenzialmente brevissimo. Inoltre, la “lettura” della pleura parietale parrebbe più semplice, meno influenzata da alcuni fattori confondenti (es. imbrattamento ematico, retrazioni cicatriziali del polmone) e potenzialmente praticabile anche *a posteriori*, mediante l'analisi di immagini. In tal senso sono attualmente in corso ulteriori indagini, al fine di valutare l'uniformità di giudizio fra operatori utilizzando diversi sistemi di *score*, sia al macello che in remoto su immagini in formato digitale.

CONCLUSIONI

L'ispezione della pleura parietale e la punteggiatura delle lesioni eventualmente presenti si è dimostrata semplice e di rapida esecuzione, proponendosi come possibile alternativa al metodo SPES.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Andrea Paolini e Vittorio Mosca, studenti della Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, per la fattiva collaborazione.

BIBLIOGRAFIA

- 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 Anim Rev. 13, 161–165.
- Faul F., Erdfelder E., Lang A.G., Buchner A. (2007) “G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences”. Behav Res Methods 39(2), 175-191.
- Luppi A., Merialdi G. (2013) “Lesioni al macello” in: Martelli P. “Le patologie del maiale”, 1a ed, Milano, Point Veterinaire Italie, 199-218.
- Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. (2012) “Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors”. Vet J. 193, 234–239.
- Scollo A., Gottardo F., Contiero B., Mazzoni C., Leneveu P., Edwards SA. (2017) “Benchmarking of pluck lesions at slaughter as a health monitoring tool for pigs slaughtered at 170kg (heavy pigs)”. Prev Vet Med. 144, 20-28.
- Sibila M., Aragón V., Fraile L., Segalés J. (2014) “Comparison of four lung scoring systems for the assessment of the pathological outcomes derived from *Actinobacillus pleuropneumoniae* experimental infections”. BMC Vet Res. 10, 165.

IDENTIFICAZIONE DI NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA

IDENTIFICATION OF GII NOROVIRUS IN SWINE FAECAL SAMPLES IN NORTHERN ITALY

RIZZO G.¹, CAVICCHIO L.¹, AMATO L.¹, VIERIA J.T.¹, FORZAN M.², USTULIN M.¹, MONNE I.¹, VIO D.¹, BONFANTI L.¹, BEATO M.S.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, (IZSVe), Viale dell'Università 10, 35020, Legnaro (Padova), Italy;

² Università di Pisa, Veterinary Sciences Department, Viale delle Piagge, 2, 56124 PISA, Italy.

Parole chiave: Norovirus (NoVs), suino, GII

Keywords: Norovirus (NoVs), swine, GII

Riassunto: I Norovirus (NoVs) sono considerati una delle principali cause di gastroenteriti acute virali nell'uomo a livello globale. Tali virus, appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, sono classificati in 5 genogruppi (G), da GI a GV, suddivisi in 30 genotipi. NoVs umani associati a gastroenterite appartengono ai genogruppi GI, GII e GIV. I NoVs sono stati riscontrati in diverse specie animali, inclusi i suini. L'individuazione di NoV umano GII.4 in feci e prodotti di carne cruda suina ha sollevato preoccupazioni per la salute pubblica circa il potenziale zoonotico di questo virus e il ruolo del suino nell'epidemiologia di questa infezione come possibile fonte di nuovi genotipi ricombinanti pericolosi per l'uomo. Attualmente sono assenti in letteratura dati sulla prevalenza in Italia di NoVs nel serbatoio animale, quale il suino: l'unico caso descritto è relativo a un NoV GII.11, individuato a partire da un campione di feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica.

Nel presente studio sono riportati i risultati derivanti da una prima indagine conoscitiva sulla presenza e circolazione di Calicivirus nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia. Dal campionamento di feci eseguito al macello, è stato possibile identificare NoV GII. Tali dati confermano la presenza di Norovirus nel suino in Italia e sottolineano la necessità di acquisire ulteriori dati anche a livello europeo.

Abstract: Noroviruses (NoVs) are one of the major causative agents of non-bacterial gastroenteritis in humans all over the world. NoVs, belonging to *Caliciviridae*, are classified into five genogroups (G), from GI to GV, which are further subdivided into 30 genotypes. NoVs identified in human gastroenteritis cases are only GI, GII and GIV. NoVs have also been isolated from several animal species, including pigs. Detection of GII.4 NoV in swine fecal and retail raw meat samples has raised public health concerns about the zoonotic potential of porcine NoVs and the role of swine in the epidemiology of this infection, as possible source of new viral recombinant strains that can be dangerous for human. Currently, there are no data on the prevalence in Italy of Norovirus in the animal reservoir, such as the pig: the only case described is related to a NoV GII.11, identified in swine fecal sample in absence of gastrointestinal symptomatology.

This study reports results deriving from a first cognitive survey on Calicivirus's presence and circulation, in Veneto and Friuli Venezia Giulia's pig population. Out of 97 faeces samples analyzed, two NoV GIIs have been identified. These data confirm the presence of this important etiological agent in the Italian swine population as previously reported, underlying the necessity to further investigate the prevalence in Italy and other European countries.

INTRODUZIONE

A livello mondiale si stima che, nell'uomo, circa il 90% dei casi di gastroenterite virale, dovuti all'ingestione di alimenti contaminati, siano causati da Norovirus (NoVs). Tali forme infettive hanno un forte impatto negativo sulla sanità pubblica, risultando un'emergenza sanitaria secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità [1]. La trasmissione di NoV avviene principalmente per via oro-fecale attraverso l'ingestione di alimenti, molluschi, verdura o acqua contaminati in diversi punti della filiera, e secondariamente per via aerea, attraverso il contatto con persone infette o a seguito di formazione di particelle di aerosol generate da episodi di vomito 'a getto' [2]. Inoltre, l'eliminazione fecale del NoV, pre-clinica e prolungata, rispetto all'insorgenza della sintomatologia, aumenta nella popolazione il rischio di eventuali infezioni e re-infezioni. Tali modalità di trasmissione associate a determinate caratteristiche del virus quali bassa dose infettante, elevata resistenza ambientale ed eterogeneità genetica, rendono i NoVs altamente contagiosi e capaci di diffondersi velocemente in ambienti chiusi e in piccole comunità come i luoghi di lavoro, i centri di assistenza medica, gli asili e le scuole [3].

I Norovirus sono virus di piccole dimensioni (circa 25-35nm), con capsidi icosaedrico ma privi di envelope, appartenenti alla famiglia *Caliciviridae*. Presentano un genoma a RNA a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA), lungo circa 7,5Kb, organizzato in tre Open Reading Frame (ORFs) codificanti rispettivamente per proteine non strutturali (ORF1), tra cui la RNA polimerasi RNA-dipendente - RdRp, per la proteina maggiore del capsido Viral Protein 1 -VP1 (ORF2) e per la proteina minore del capsido Viral protein 2-VP2 (ORF3) [4]. Sono classificati in cinque genogruppi (GI – GII – GIII – GIV – GV) in base alla composizione amminoacidica della proteina maggiore VP1 del capsido, coinvolta nei meccanismi di interazione recettoriale e specificità di legame virus-cellula ospite [5]. All'interno dei cinque genogruppi, vengono distinti un totale di 30 diversi genotipi. L'alto tasso di mutazione e la ricombinazione genica, che nei NoV avviene frequentemente in una regione *hotspot* a livello della giunzione ORF1/ORF2 mediante un meccanismo simile al crossing-over, rendono spesso la classificazione alquanto complessa. Infatti, oltre all'individuazione di nuovi genotipi e specie, è frequente isolare ceppi ricombinanti con caratteristiche genotipiche intermedie, difficili da classificare [6].

I virus appartenenti ai gruppi GI, GII e GIV sono responsabili di gastroenteriti acute nell'uomo. In particolare, il genotipo 4 del genogruppo II (GII.4) è responsabile di circa l'85% degli episodi epidemici di gastroenterite nell'uomo. La variante NoV GII.4 Sydney, isolata per la prima volta in Australia nel 2012, sembra essere associata a livello globale a tali focolai infettivi [7].

I suini ospitano, nel loro tratto gastroenterico, NoVs appartenenti al solo gruppo GII, quali GII.11, GII.18, GII.19, molto simili dal punto di vista genetico e antigenico ai NoVs GII umani [8]. NoVs GII.11, GII.18 e GII.19 sono stati isolati sia in feci di animali clinicamente asintomatici sia in feci di animali affetti da patologia gastroenterica [9, 10]; tali genotipi riscontrati nei soli suini non sono mai stati identificati nell'uomo. Al contrario, il genotipo umano NoV GII.4 è stato isolato sia in feci di suino, dimostrando come tale virus possa infettare uomo e ospite animale anche in condizioni naturali, sia in prodotti di carne suina, suggerendo una possibile trasmissione zoonotica attraverso la catena alimentare [11]. Tali evidenze sperimentali hanno posto l'attenzione sul potenziale zoonotico dei Norovirus e sul ruolo del suino nell'epidemiologia di questa complessa infezione, anche come fonte di nuovi genotipi pericolosi per l'uomo. Attualmente sono assenti in letteratura dati sulla presenza in Italia di NoVirus nel serbatoio animale, quale il suino: l'unico caso descritto è relativo a un NoV GII.11, individuato a partire da un campione di feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica [12].

Nel presente contributo sono riportati i risultati derivanti da una prima indagine conoscitiva sulla presenza e circolazione di Calicivirus, e più in dettaglio Norovirus, nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati in totale 18 intestini di suino provenienti dal Friuli Venezia Giulia, prelevati da capi risultati affetti da patologia gastroenterica all'esame autoptico, e 79 pool di feci, prelevati in due differenti macelli del Veneto e Friuli Venezia Giulia, nel periodo compreso tra Marzo e Giugno 2017. In assenza di dati bibliografici relativi alla prevalenza inter-aziendale, la numerosità campionaria minima necessaria per la stima della prevalenza di Norovirus in ogni Regione è stata calcolata ipotizzando una prevalenza del 50% (con una confidenza del 95% e un margine di errore del 5%) e ripartita proporzionalmente sulla base della popolazione di allevamenti di suini da ingrasso complessiva nelle due Regioni. Il numero complessivo delle aziende da ingrasso, attive al 31/12/2016, era pari a 396 per il Friuli Venezia Giulia e 1411 per il Veneto. Un'azienda è stata definita "attiva" quando è stato registrato in Banca Dati Regionale dell'Anagrafe Zootecnica Regionale almeno un censimento con n. capi > 0 o una movimentazione di animali nell'anno di riferimento. Il campionamento è stato svolto in sede di macellazione presso stabilimenti regionali selezionati in base al numero di aziende conferenti capi. Le feci sono state raccolte in pool da 5 individui per azienda. Dei 79 campioni di feci, 46 campioni provenivano da allevamenti suinicoli della regione Veneto e 33 da allevamenti suinicoli del Friuli Venezia Giulia. In Veneto sono state campionate le province di: Padova, Vicenza, Treviso, Rovigo, Belluno, Venezia e Verona; per il Friuli le province di: Pordenone, Udine e Gorizia, per un totale di 40 aziende in Veneto e 39 in Friuli.

L'RNA è stato estratto, per i campioni d'intestino, con kit commerciale "High Pure RNA Tissue kit" (Roche Life Science) a partire da 20-40mg di tessuto omogenati in 0,5ml di MEM (Minimal Essential Medium, Sigma Aldrich) supplementato con 1% di PenStrep (10000 UI/ml di Penicillina G, 100mg/ml di Streptomycin), mediante Tissue Lyser (Qiagen). Per ciascun campione di feci, 1gr di materiale è stato diluito 1:5 (w/v) in 4ml di MEM supplementato con 1% di PenStrep. Il campione è stato quindi miscelato con vortex e centrifugato per 5 minuti a 14000xg e il surnatante utilizzato per l'estrazione dell'RNA mediante il kit "QIAamp Viral RNA mini kit" (QIAGEN). Gli estratti, trattati con DNAasi, sono stati conservati a -80°C fino al momento dell'utilizzo.

La fase di RetroTrascrizione (RT) degli RNA in cDNA è stata eseguita utilizzando dei random primers e seguendo le istruzioni d'uso riportate nel kit "SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" (Invitrogen). Al fine di non escludere nell'analisi molecolare alcuna variante di Norovirus animale, si è scelta come metodica di screening una PCR in grado di identificare tutti i generi virali appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, ragione per la quale, per confermare un eventuale campione positivo per Norovirus, si è reso necessario il sequenziamento del prodotto di PCR ottenuto. Tale PCR utilizza la coppia dei primers "p290-p110", che hanno come target un frammento di 300 paia di basi (bp) del gene codificante per l'RdRp [13]. La fase di amplificazione dei cDNA è stata condotta con il kit "GoTaq G2 Flexi" (Promega).

I prodotti di PCR sono stati in seguito visualizzati su gel di acrilamide al 7%, colorato mediante impregnazione argentea. Gli amplificati dei campioni risultati positivi mediante PCR, che hanno mostrato su gel una banda idonea in termini di dimensioni e quantità dell'amplificato, sono stati sequenziati mediante metodo Sanger, utilizzando la coppia di primers "p290-p110". Le sequenze ottenute del gene RdRp, lunghe circa 300 nucleotidi, sono state confrontate con quelle attualmente disponibili in GenBank usando il software BLAST.

RISULTATI

Quattordici campioni (13 feci e 1 intestino) su 97 analizzati (79 feci e 18 intestini) sono risultati positivi mediante RT-PCR “p290-p110”. I campioni risultati positivi per la presenza del gene RdRp provengono sia dalla regione Veneto (6 campioni di feci) e sia dal Friuli Venezia Giulia (7 campioni di feci e 1 intestino). I 6 campioni di feci positivi riscontrati in Veneto appartengono ad aziende zootecniche situate nella provincia di Padova (2 campioni), Verona (2 campioni), Treviso (1 campione), Belluno (1 campione). I rimanenti 8 campioni positivi riscontrati in Friuli Venezia Giulia provengono da aziende situate nelle provincie di Pordenone (6 campioni di feci) ed Udine (1 campione di feci e 1 intestino).

A causa della presenza, in alcuni campioni, di bande di debole intensità in termini di quantità di amplificato, solo per 4 campioni è stato possibile ottenere il dato relativo alla tipizzazione molecolare in base alla sequenza nucleotidica del frammento dell’RdRp. Nello specifico, l’analisi di sequenza ha evidenziato per due campioni di feci una similarità nucleotidica, compresa tra l’89% e il 92%, con NoVs suini isolati in Europa. Per i restanti due campioni, 1 di feci e 1 di intestino, l’analisi di sequenza ha evidenziato una similarità nucleotidica, compresa tra l’87% e il 90%, con Sapovirus di origine suina.

DISCUSSIONE

Tramite analisi di sequenza del frammento del gene RdRp, è stato possibile identificare due Sapovirus e due Norovirus di origine suina. I due campioni risultati positivi per Sapovirus, 1 di feci e 1 di intestino, provengono rispettivamente dalla provincia di Verona e dalla provincia di Udine. La sequenza relativa all’amplificato del campione positivo proveniente da Verona ha una similarità nucleotidica dell’87% con un Sapovirus suino isolato in Canada nel 2005 [14], mentre per il secondo campione di intestino proveniente da Udine l’analisi di sequenza ha evidenziato una similarità nucleotidica del 90% con un Sapovirus suino isolato in Irlanda nel 2005 [15].

I due campioni risultati positivi per Norovirus provengono da due diversi allevamenti suinicoli della regione Veneto, siti nello specifico nelle province di Padova e Verona. Nessuna positività è stata riscontrata nei campioni provenienti dal Friuli Venezia Giulia.

Il NoV identificato nella provincia di Padova presenta una similarità tra l’87% e l’89% con sequenze parziali di Norovirus suini identificati in Europa, Brasile e in America dal 2008 ad oggi, ed in particolare con un campione di NoVs suino identificato in Danimarca nel 2009 e un NoV GII isolato in suino a partire da contenuto intestinale in Brasile nel 2008 [16]. Il NoV identificato nella provincia di Verona presenta omologia del 92% solo con tre sequenze depositate in GenBank, di cui due sequenze riferibili a due NoVs isolati in suini in Olanda nel 2009 [17] e una terza sequenza di un NoV GII.11 isolato a partire da feci di suino in Taiwan nel 2008 [18].

Le basse omologie riscontrate dall’analisi di sequenza necessitano di considerazioni e interpretazioni.

In primo luogo, il numero di sequenze disponibili in Genbank di NoVs animali è molto limitato. Inoltre, il frammento del gene RdRp analizzato ha una lunghezza di circa 300bp, dimensione esigua rispetto ai 7,5Kb del genoma virale. Di conseguenza, il sequenziamento di una porzione genica maggiore, quale il gene VP1 (proteina del capsido), anche ai fini dell’analisi filogenetica, potrebbe consentire di ottenere informazioni più esaustive circa la tipizzazione e classificazione dei NoV isolati.

I dati presenti in letteratura circa la presenza di NoV nella popolazione suina non sono omogenei. Diversi studi riportano la rilevazione di NoVs non a seguito di campionamenti strutturati ma come identificazioni occasionali effettuate a partire da campioni precedentemente archiviati in laboratorio per altri scopi, solo una parte di questi studi si basano su campionamenti

effettuati ad hoc. In questo ultimo caso rimane comunque difficile paragonare i dati, in quanto gli schemi di campionamento sono diversi e pochi mettono in relazione i risultati ottenuti con l’età dell’animale, la stagionalità e la presenza o meno di sintomatologia gastroenterica.

CONCLUSIONI

Attualmente, l’unico caso descritto circa la presenza di NoVs nel suino in Italia, è relativo a un NoV GII.11, individuato in una collezione di 201 campioni di feci archiviati, prelevati da animali asintomatici in due periodi distinti, Gennaio-Giugno 2006 e Novembre-Dicembre 2007, in allevamenti suinicoli del Nord Italia. Nello specifico, il NoV GII.11 è stato isolato da feci di un suino di 3 mesi d’età.

Il presente studio conferma la presenza di NoV nella popolazione suina italiana, già precedentemente rilevata nel 2011, con l’identificazione di due ceppi NoV nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia, riconducibili in base ai dati attualmente a disposizione a genotipi appartenenti al genogruppo GII. Ulteriori analisi molecolari sul gene VP1 consentiranno di caratterizzare ulteriormente i due ceppi isolati e individuare possibili ceppi ricombinanti.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC 12/15).

BIBLIOGRAFIA

- 1) Belliot G., Lopman B.A., Ambert-Balay K., Pothier P. (2014) “The burden of norovirus gastroenteritis: an important foodborne and healthcare-related infection”. *Clin Microbiol Infect* 20:724-30.
- 2) Mathijs E., Stals A., Baert L., Botteldoorn N., Denayer S., Mauroy A. et al. (2012) “A review of known and hypothetical transmission routes for noroviruses” *Food Environ Virol* 4:131-52.
- 3) Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Toren K., Andersson L.M., Westin J. et al. (2014) “Norovirus GII.4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks” *J Clin Microbiol* 52:2352-8.
- 4) de Rougemont A., Ambert-Balay K., Belliot G., Pothier P. (2010) “Norovirus infections: an overview” *Med Sci (Paris)* 26:73-8.
- 5) Zheng D.P., Ando T., Fankhauser R.L., Beard R.S., Glass R.I., Monroe S.S. (2006) “Norovirus classification and proposed strain nomenclature” *Virology* 346:312–323.
- 6) Bull R.A., Hansman G.S., Clancy L.E., Tanaka M.M., Rawlinson W.D., White P.A. (2005) “Norovirus Recombination in ORF 1/2 overlap” *Emerg Infect Dis* 11:1079–85.
- 7) Zhang J., Shen Z., Zhu Z., Zhang W., Chen H., Qian F. et al. (2015) “Genotype distribution of norovirus around the emergence of Sydney_2012 and the antigenic drift of contemporary GII.4 epidemic strains” *J Clin Virol* 72:95-101.
- 8) Wang Q-H., Han M.G., Cheetham S., Souza M., Funk J.A., Saif L.J. (2005) “Porcine noroviruses related to human noroviruses” *Emerg Infect Dis* 11:1874–1881.
- 9) Machnowska P., Ellerbroek L., John R. (2014) “Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany” *Vet Microbiol* 168:60-8.
- 10) Silva P.F., Alfieri A.F., Barry A.F., de Arruda Leme R., Gardinali N.R., van der Poel W.H. et al. (2015) “High frequency of porcine norovirus infection in finisher units of Brazilian pig-production systems” *Trop Anim Health Prod* 47:237-41.
- 11) Mattison K., Shukla A., Cook A., Pollari F., Friendship R., Kelton D., Bidawid S., Farber J.M. (2007) “Human norovirus in swine and cattle” *Emerg Infect Dis* 13:1184-88.

- 12) Di Bartolo I., Tofani S., Angeloni G., Ponterio E., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2014) "Detection and characterization of porcine caliciviruses in Italy" Arch Virol 159:2479-84.
- 13) Jiang X., Huang P.W., Zhong W.M., Farkas T., Cubitt D.W., Matson D.O. (1999) "Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR" J Virol Methods 83:145-154.
- 14) L'Homme Y., Sansregret R., Plante-Fortier E., Lamontagne A.M., Lacroix G., Ouardani M., Deschamps J., Simard G., Simard C. (2009) "Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007" Arch Virol 154:581-593.
- 15) Collins P.J., Martella V., Buonavoglia C., O'Shea H. (2009) "Detection and characterization of porcine sapoviruses from asymptomatic animals in Irish farms" Vet Microbiol 139:176-182.
- 16) Cunha J.B., de Mendonca M.C., Miagostovich M.P., Leite J.P. (2010) "Genetic diversity of porcine enteric caliciviruses in pigs raised in Rio de Janeiro State, Brazil" Arch Virol 155:1301-1305.
- 17) Mauroy A., Van der Poel W.H., der Honing R.H., Thys C., Thiry E. (2012) "Development and application of a SYBR green RT-PCR for first line screening and quantification of porcine sapovirus infection" BMC Vet Res 8: 193
- 18) Chao D.Y., Wei J.Y., Chang W.F., Wang J., Wang L.C. (2012) "Detection of multiple genotypes of calicivirus infection in asymptomatic Swine in Taiwan" Zoonoses Public Health 59:434-444.

INDAGINE SULLE PERFORMANCES PRODUTTIVE DI SCROFETTE A SEGUITO DELL'UTILIZZO DI ALTRENOGEST PER LA SINCRONIZZAZIONE DELL'ESTRO

SURVEY ON PRODUCTIVE PERFORMANCES OF GILTS AFTER ALTRENOGEST ADMINISTRATION FOR OESTRUS SYNCHRONIZATION

ROMANO, G.¹, TAGLIAFERRI, L.¹, MAZZONI, C.¹, CASAPPA, P.², SCOLLO, A.¹

¹ Suivet, Via Martiri della Bettola 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italia; ² Ceva Salute Animale

Parole chiave: altrenogest, scrofette, parametri produttivi

Key words: altrenogest, gilts, productive parameters

Riassunto: Un'adeguata strategia di trattamento con altrenogest è uno strumento diffuso per migliorare il livello di efficienza riproduttiva delle scrofette puberi, permettendo di ridurre il numero di animali necessari a soddisfare gli obiettivi riproduttivi e produttivi aziendali grazie alla sincronizzazione dell'estro degli individui che vengono avviati alla carriera riproduttiva. Scopo del presente lavoro è verificare gli effetti dell'introduzione di un protocollo con altrenogest sulla produttività aziendale. Lo studio ha coinvolto otto scrofaie, ciascuna delle quali ha fornito i dati relativi a 60 scrofette trattate con altrenogest per la sincronizzazione dell'estro e a 60 scrofette non trattate, per un totale complessivo di 960 animali. I parametri produttivi non solo non hanno subito variazioni negative, ma, per alcune aziende, hanno addirittura migliorato alcuni dati, tra cui il numero medio di nati totali.

Abstract: An adequate treatment strategy with altrenogest represents a widespread tool to achieve a high level of reproductive efficiency in gilts, as it allows to reduce the number of animals necessary to ensure the reproductive objectives by resorting to their oestrus synchronization. The aim of this work is to verify the effects of its use on productivity on the following farrowing. Eight farrowing sows were involved, each of which provided data on 60 gilts treated with altrenogest for the synchronization of the oestrus and 60 untreated, for a total of 960 animals. The parameters were not negatively influenced, and for some farrowing sites the average number of total births has improved.

INTRODUZIONE

L'industria suinicola si contraddistingue per la sua competitività e, per questo motivo, risulta di fondamentale importanza raggiungere un elevato livello di efficienza riproduttiva. Scarse performance in questo settore, infatti, potrebbero compromettere l'intera produzione, determinando così un ingente danno economico per l'allevatore.

Un'adeguata strategia di trattamento ormonale rappresenta lo strumento migliore per far fronte a questa situazione (Coffey *et al.*, 1997), in quanto permette la riduzione del numero di scrofette necessarie a soddisfare gli obiettivi riproduttivi aziendali grazie alla sincronizzazione dell'estro, che, altrimenti, si manifesterebbe in maniera non regolare, con una più difficile gestione del periodo riproduttivo. Nelle scrofette prepuberi è possibile ottenere un certo grado di sincronizzazione anche solo mediante l'impiego opportuno del verro o la somministrazione di gonadotropine esogene (Kirkwood, 1997), mentre nelle scrofe e scrofette ciclanti è necessario l'utilizzo del progesterone al fine di raggiungere un'efficace sincronizzazione dell'estro (Gerrits and Johnson, 1965; Polge *et al.*, 1968; Dimitrov *et al.*, 2010).

Un prodotto ormonale attualmente disponibile per ottenere una sincronizzazione dell'estro abbastanza precisa e prevedibile è il progestinico orale, l'altrenogest: i protocolli del trattamento standard con l'altrenogest possono variare prevedendo l'integrazione nel mangime di 15 o 20 mg/gg di prodotto per un periodo di 14 o 18 giorni (Kraeling *et al.*, 1981; Martinat-Botte *et al.*, 1995), dosaggio che è stato dimostrato non interferire con lo sviluppo follicolare nel post-svezzamento (Van Leeuwen *et al.*, 2010). Dopo la fine del trattamento, il 93% delle scrofette manifesta l'estro entro 5-7 giorni, oltre a evidenziare un notevole miglioramento della portata al parto (Martinat-Botte *et al.*, 1995). La risposta estrale, inoltre, può essere aumentata grazie all'impiego di PGF2 α e gonadotropine alla fine del trattamento (Estill, 2000).

È interessante notare come, nelle cavalle (Lofstedt e Patel, 1989), nelle bovine (Sirois e Fortune, 1990; Kinder *et al.*, 1996) e nelle pecore (Flynn *et al.*, 2000), la somministrazione di progesterone per lunghi periodi di tempo determini la compromissione della secrezione dell'ormone luteinico (LH), dello sviluppo follicolare, della qualità degli ovociti, dell'ambiente uterino e della fertilità. Dati recenti mostrano infatti che un breve trattamento con il progesterone (5 giorni) aumenta maggiormente la fertilità nelle bovine da latte rispetto all'impiego standard di 9 giorni (Garcia-Isperto *et al.*, 2013). Attualmente non si è a conoscenza di effetti simili nelle scrofette, ma al momento della somministrazione di altrenogest alcuni animali si troveranno nell'ultima fase luteinica, quindi l'attività progestinica endogena, conseguente a quella esogena, potrebbe agire sull'ovaio anche per più di 30 giorni, compromettendone così la fertilità; al contrario, un breve periodo di trattamento potrebbe comportare un miglioramento della fertilità. Scopo del presente lavoro è stato verificare, tramite un'indagine su otto scrofaie differenti, se a livello aziendale l'utilizzo di altrenogest sulle scrofette abbia influito ed in che misura sulle loro performances riproduttive considerando, oltre alla portata al parto, anche i dati di prolificità del parto successivo al trattamento.

MATERIALI E METODI

I dati della presente indagine sono stati raccolti tramite i software (Isaporc, HPA, Farmer e FARM) già presenti in otto scrofaie differenti localizzate nelle regioni Veneto, Emilia-Romagna, Lombardia e Friuli Venezia-Giulia. Le aziende, nel corso degli anni 2016-2017, avevano cambiato la gestione delle scrofette introducendo l'altrenogest oppure rimuovendolo se prima lo utilizzavano. In questo modo, ciascuna azienda ha potuto fornire a dati relativi a 60 parti di scrofette trattate con altrenogest ed altrettanti di scrofette non trattate (120 scrofette in totale per ciascuna azienda), per un totale di 960 animali coinvolti (480 trattati; 480 non trattati). Per superare l'influsso delle influenze stagionali, le 60 scrofette trattate appartenevano allo stesso periodo dell'anno delle 60 controllo, sebbene di anni diversi (2016-2017). Gli allevamenti coinvolti sono tutti di tipo convenzionale intensivo, con un minimo di 500 scrofe ed un massimo di 4.000. Tutti gli allevamenti hanno adottato un utilizzo conforme a quanto consigliato dalla ditta produttrice, somministrando il prodotto (Altresyn®, Ceva Salute Animale) per via orale alla dose giornaliera di 20 mg di altrenogest per capo, corrispondenti a 5 ml di prodotto/capo per 18 giorni consecutivi.

I parametri produttivi estrapolati dai software aziendali per l'analisi sono stati la percentuale di portata al parto, il numero di nati totali, dei nati vivi, dei nati morti, dei mummificati e degli svezzati alla fine della lattazione.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il ciclo estrale della scrofa può essere controllato mediante l'uso di progestinici che bloccano la fase follicolare. L'altrenogest è un progestinico ad uso orale, che può essere somministrato

alle scrofette puberi per bloccare il ciclo estrale. Durante la somministrazione di altrenogest in tali soggetti, i corpi lutei regrediscono normalmente, ma a causa della soppressione dell'LH (ormone luteinizzante), la crescita follicolare si ferma ad uno stadio di accrescimento intermedio, con la conseguenza di una fase luteinica prolungata artificialmente. A partire da 8-12 ore dall'ultima somministrazione di altrenogest, aumenta l'attività pulsatile dell'LH ed inizia la fase follicolare del ciclo estrale, permettendo alle femmine di mostrare il calore, solitamente da 5 a 8 giorni dopo. Convenzionalmente, il ruolo dell'altrenogest è quello di sincronizzare le scrofette per l'ingresso nel programma riproduttivo aziendale. Questo riduce la necessità di avere numeri elevati di animali destinati alla rimonta poiché ne ottimizza la gestione, con evidenti riduzioni di costo d'acquisto (o di produzione), di costi alimentari e di manodopera. In tutte le aziende facenti parte del presente studio, il trattamento con altrenogest ha efficacemente sincronizzato le scrofette all'interno della banda, ottenendo lo scopo primario di ottimizzare la gestione delle nullipare.

Malgrado l'efficiente sincronizzazione degli estri, alcuni autori riportano per specie diverse da quella suina che la fertilità possa essere ridotta da lunghi periodi di somministrazione dell'ormone a causa della compromissione della secrezione dell'LH, dello sviluppo follicolare, della qualità degli ovociti e dell'ambiente uterino (nelle cavalle: Lofstedt e Patel, 1989; nelle bovine: Sirois e Fortune, 1990; Kinder *et al.*, 1996; nelle pecore: Flynn *et al.*, 2000). Il presente lavoro sembra suggerire invece che la scrofetta non sia soggetta a questo effetto, almeno considerando la totalità dei dati raccolti. Infatti, i dati medi osservati nel gruppo di scrofette trattate con altrenogest e in quello delle non trattate (Tabella 1) non differiscono per la maggior parte dei parametri, evidenziando invece una sensibile riduzione nel numero di suinetti mummificati (P = 0,002).

Gruppo	Portata al parto (%)	Nati totali (n)	Nati vivi (n)	Nati morti (n)	Mummificati (n)	Svezzati (n)
Controllo	79,5	12,6	12	0,6	1,1	10,9
Altrenogest	78,9	12,9	12	0,7	0,5	11,0
P value	ns	ns	ns	ns	0,002	ns
Totale complessivo	79,2	12,8	12	0,6	0,8	11,0

Tabella 1. Medie di ciascun parametro osservato nei due gruppi di osservazione. Nessuna variabile è risultata essere alterata dal trattamento con altrenogest.

Table 1. Average values for each observed parameter within both treatment groups. No influence due to treatment was observed.

Considerando ciascuna azienda separatamente, emerge come non solo non siano presenti peggioramenti, ma che per alcuni parametri si assiste ad un miglioramento. Ciò che più evidenzia il miglioramento delle performances è il numero di nati totali. Il Grafico 1 riporta il dato per ciascuna azienda, mentre nella Tabella 2 sono riportati i singoli valori. Pur essendo presente un'azienda (la numero 4) che eccezionalmente mostra una riduzione del numero di nati vivi, tre aziende (i numeri 5, 6, 7) mostrano invece l'incremento dei nati vivi rispettivamente di +1,15; +1,28; +1,23 suinetti per scrofetta al primo parto. All'interno del bilancio economico della scrofaia, questo miglioramento si va ad aggiungere al beneficio della sincronizzazione degli estri delle scrofette, con un guadagno aggiuntivo dovuto alla produzione di un numero maggiore di suinetti.

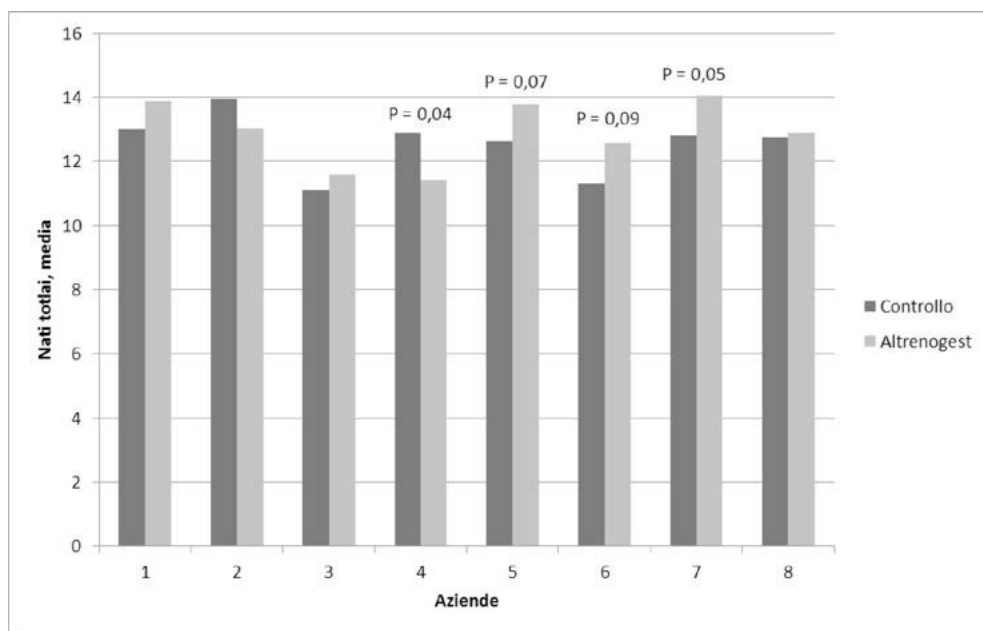


Grafico 1. Numero medio di nati vivi nei due gruppi di osservazione per ciascuna delle otto aziende coinvolte nello studio.

Graph 1. Average number of live born piglets in both treatment groups for each of the eight farrowing sites involved in the study.

Scrofaia	Numero di nati totali		
	Controllo	Altrenogest	Totale complessivo
1	13,0	13,9	13,4
2	14,0	13,0	13,5
3	11,1	11,6	11,3
4	12,9	11,4	12,2
5	12,6	13,8	13,3
6	11,3	12,6	12,0
7	12,8	14,0	13,4
8	12,8	12,9	12,8
Totale complessivo	12,6	13,0	12,8

Tabella 2. Media del numero di nati totali per ciascuna azienda coinvolta nello studio nei due gruppi di osservazione.

Table 2. Average number of total live birth for each farrowing site involved in the study considering both treatment groups.

In conclusione, l'uso di altrenogest nella scrofa è efficace nella sincronizzazione degli estri e nella specie suina può essere considerato un intervento ormonale che non determina, come osservato da altri autori in altre specie, una compromissione delle performances produttive.

BIBLIOGRAFIA

- Coffey R.D., Parker G. R., Laurent K. M. (1997) "Manipulation of the estrus Cycle in Swine". University of Kentucky College of Agriculture Cooperative Extension Service, Lexington, Kentucky, USA. Online publication ASC-152.
- Dimitrov S., Bonev G., Taseva H. (2010) "Synchronization of estrous in gilts with Altrenogest". Agricultural Science and Technology, vol. 2, No 1, pp 3 - 5.
- Estill C. T. (2000) "Current concepts in oestrus synchronization in swine". Journal of Animal Science, 77:1-9.
- Flynn J. D., Duffy P., Boland M. P., Evans A. C. O. (2000) "Progestagen synchronization in the absence of a corpus luteum results in the ovulation of a persistent follicle in cyclic ewe lambs". Animal Reproduction Science, 62: 285-296.
- Garcia-Ispuerto I., Rosellò M. A., De Rensis F., Lòpez-Gatius F. (2013) "A five-day progesterone plus eCG-based fixed-time AI protocol improves fertility over spontaneous estrus in high-producing dairy cows under heat stress". Journal of Reproduction and Development, 59: 544-548.
- Gerrits R. J. and Johnson L. A. (1965) "Synchronization of estrus in gilts fed two levels of I.C.I. 33.828 and the effect on fertility, embryo survival and litter size". Journal of Animal Science, Suppl. 1, 917-918.
- Kinder J. E., Kojima F. N., Bergfeld E. G., Wehrman M. E., Fike K. E. (1996) "Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle". Journal of Animal Science, 74: 1424-1440.
- Kirkwood R. N. (1997) "Pharmacological intervention in swine reproduction". Swine Health Production, 7: 29-35.
- Kraeling R. R., Dziuk P. J., Pursel V. G., Rampacek B., Webel S. K. (1981) "Synchronization of estrus in swine with allyl trenbolone (RU-2267)". Journal of Animal Science, 52: 831-835.
- Lofstedt R. M., Patel J. H. (1989) "Evaluation of the ability of altrenogest to control the equine estrous cycle". Journal of the American Veterinary Medical Association, 194: 361-364.
- Martinat-Botte F., Bariteau F., Forgorit Y., Macar C., Poirier P., Terqui M. (1995) "Synchronization of estrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival". Animal Reproduction Science 39, 267-274.
- Polge C. B., Day B. N. and Groves T. W. (1968) "Synchronization of ovulation and artificial insemination in pig". Veterinary Record, 83,136-142.
- Sirois J., Fortune J. E. (1990) "Lengthening the bovine estrous cycle with levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance". Endocrinology, 127: 916-925.
- Van Leeuwen J. J., Williams S. I., Kemp B., Soede N. M. (2010) "Post-weaning altrenogest treatment in primiparous sows; the effect of duration and dosage on follicle development and consequences for early pregnancy". Animal Reproduction Science 119, 258-264.

IL TRATTAMENTO DELLA DIARREA SOTTOSCroFA E LA VALUTAZIONE DELL'USO DI MOLECOLE ANTIBATTERICHE CRITICHE PER LA SALUTE UMANA

TOWARDS THE REDUCTION OF CRITICALLY IMPORTANT ANTIBIOTICS: TREATMENT OF DIARRHEA IN NURSERY PIGLETS

TAGLIAFERRI, L.¹, ROMANO, G.¹, CASAPPA, P.², MAZZONI, C.¹, SCOLLO, A.¹

¹ Medico Veterinario, Suivet snc; ² Ceva Salute Animale

Parole chiave: Suino, uso responsabile dell'antibiotico, sottoscrofa, antibiotici critici

Key words: Swine, responsible use of antibiotics, nursery piglets, critically important antibiotics

Riassunto: Gli antibiotici sono largamente utilizzati in zootecnia, sia in metafilassi per ridurre la disseminazione di un'infezione all'interno di una popolazione, sia in terapia per il trattamento degli individui malati. A prescindere dal tipo di utilizzo, è ormai indispensabile cercare di ridurre l'utilizzo di quei principi attivi definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità come "critici" per la salute umana a causa del rischio di antibiotico resistenza. Scopo del presente lavoro è stato paragonare gli effetti dell'amminosidina e dell'enrofloxacinina nel trattamento della diarrea neonatale, considerando che l'enrofloxacinina appartiene ad una classe di antibiotici "critici" e dunque potenzialmente più soggetti ad essere sottoposti a valutazione nel momento di effettuare un trattamento. Lo studio è stato condotto in una scrofaia commerciale e ha coinvolto 40 nidiatae i cui suinetti avevano mostrato sintomi clinici di diarrea 48 ore dopo la nascita. Le nidiatae sono state casualmente suddivise in due gruppi: controllo (enrofloxacinina; n=20) e amminosidina (n=20). Tutti i suinetti sono stati individualmente trattati con iniezione intramuscolare. Il peso di ciascuna nidiata è stato raccolto sia alla nascita e allo svezzamento, mentre durante la lattazione è stato annotato il numero di ricadute cliniche che avevano necessitato di un secondo trattamento. Inoltre è stato attribuito un punteggio fecale in base alla gravità clinica (0=tracce di diarrea; 1=diarrea lieve; 2=diarrea grave), ed è stato calcolato il costo del trattamento considerando la quotazione commerciale media di entrambi i prodotti. I parametri raccolti non hanno mostrato differenze tra i trattamenti. Il peso alla nascita è stato di 1.47 vs 1.38 kg (amminosidina vs controllo; P=0.370), il peso allo svezzamento di 5.64 vs 5.23 (P=0.247), il numero di suinetti svezzati per scrofa di 9.7 vs 9.8 (P=0.846), il punteggio fecale medio di 0.9 vs 1.05 (P=0.418), e il numero di ricadute 6/20 vs 4/20 (P=0.832). Anche considerando i costi, il trattamento di ciascuna nidiata (calcolando un peso medio di 2.5 kg/suinetto) è stato simile in entrambi i gruppi (1.037 vs 1.035€). I risultati suggeriscono simile efficacia dell'amminosidina e dell'enrofloxacinina nel trattamento delle diarreie sotto scrofa. Per questa ragione, in caso di sensibilità comprovata a seguito di antibiogramma, è possibile considerare l'amminosidina un principio attivo di scelta nel trattamento delle enteriti neonatali.

Abstract: Antimicrobials are used widely in livestock. This includes use as metaphylaxis to reduce spread of infections developing in food animals and therapeutic use to treat sick animals. However, this use also includes agents defined by the World Health Organization as "critically important" for human medicine due to antimicrobial resistance risk. Aim of the present work was to compare effects of aminosidine vs enrofloxacinine in the treatment of diarrhea in nursery piglets, considering enrofloxacinine belongs to a "critically important" antibiotics class and its use should be replaced when possible. The study involved 40 litters in a commercial farrowing site. Litters showed clinical diarrhea 48h after birth, and were randomly allocated to two treatment groups: control (enrofloxacinine; n=20) and aminosidine (n=20). All the piglets were individually injected. Weight at birth and at weaning were collected, as well as number of piglets requiring a second treatment (relapses). A fecal score was attributed to every litter (0=traces of diarrhea; 1=mild; 2=evident), and cost/treatment was calculated based on average commercial quotation of products. Variables collected did not differ between treatments. Weight at

birth were 1.47 vs 1.38 (aminosidine vs control; $P=0.370$), weight at weaning 5.64 vs 5.23 ($P=0.247$), number of weaned piglets 9.7 vs 9.8 ($P=0.846$), fecal scores 0.9 vs 1.05 ($P=0.418$) and number of relapses 6/20 vs 4/20 ($P=0.832$). Even considering costs, the treatment of each litter (considering a mean of 12 piglets/litter and 2.5 kg/piglet) was similar for both groups (1.037 vs 1.035€). Results suggest a similar effectiveness of aminosidine in treating nursery piglets with diarrhea compared to enrofloxacin. For this reason, in case of antibiogram sensibility to both agents, it should be considered the possibility of replacement of a “critically important” antibiotic with aminosidine as first choice of treatment.

INTRODUZIONE

Gli antibiotici sono largamente utilizzati in zootecnia. Per quanto non sia più consentito l'utilizzo non terapeutico come promotori della crescita, attualmente si sta cercando di ridurre anche l'uso profilattico o metafilattico di massa negli animali da reddito, privilegiando il trattamento individuale degli animali malati. Tuttavia, anche quando si sceglie di utilizzare la terapia individuale, vi è la necessità di ponderare attentamente anche la scelta del principio attivo da utilizzare. Infatti, l'organizzazione mondiale della sanità (World Health Organisation, WHO, 2011) ha evidenziato come alcune classi di antibiotici siano critiche per la salute umana a causa dei fenomeni di resistenza batterica e dunque vadano utilizzate con grandissima attenzione in zootecnia. Secondo il Ministero della Salute (2012), *“antibiotici critici per la salute pubblica quali le cefalosporine di 3° e 4° generazione ed i (fluoro) chinoloni dovrebbero essere utilizzati solo in base ai risultati dell'antibiogramma e utilizzati solo in situazioni che hanno risposto negativamente o si pensa, sulla base di dati pregressi sulla sensibilità degli agenti causali in allevamento, possano non rispondere a terapia con altri antibiotici.”*

Tale approccio è corretto per tutti i chemioterapici: nel presente studio si sono paragonati gli effetti dell'amminosidina e dell'enrofloxacin nel trattamento della diarrea sotto scrofa, considerando che alcune classi antibatteriche sono oggi più controllate che in passato.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in una scrofaia di circa 2400 scrofe a banda settimanale, ed ha coinvolto un totale di 40 nidiata nate nel mese di maggio. La scelta è ricaduta su questa azienda per la sua routinaria adozione di trattamenti antibiotici nei suinetti sotto scrofa a causa di persistenti enteriti da *E. Coli* manifeste dalla 48° ora di vita degli animali. Prima dell'inizio della prova, è stato effettuato un antibiogramma su materiale fecale per confermare la sensibilità batterica sia all'enrofloxacin che all'amminosidina, con tamponi rettali eseguiti su suinetti con sintomi clinici riconducibili ad enterite coliforme. Il campionamento pre-prova è stato effettuato su soggetti che non avevano subito alcun tipo di trattamento. Le 40 nidiata coinvolte nella prova sono state suddivise in due gruppi omogenei per ordine di parto delle scrofe e loro performances riproduttive: gruppo controllo (enrofloxacin; 20 nidiata) e gruppo amminosidina (20 nidiata). Tutti i baliaggi e i pareggiamenti dei suinetti coinvolti nello studio sono stati effettuati nelle prime 24 ore post-parto. Successivamente, in caso di necessità, tali operazioni sono state effettuate esclusivamente all'interno dello stesso gruppo di trattamento. Il periodo di osservazione delle nidiata si è concluso con il loro svezzamento, ovvero a 21 giorni di vita. All'insorgere della manifestazione enterica (diarrea) all'interno di ciascuna nidiata, tutti i suinetti sono stati individualmente trattati con iniezione intramuscolare seguendo la posologia registrata per i prodotti utilizzati. Tutte le nidiata sono state pesate individualmente il giorno del parto ed il giorno dello svezzamento, consentendo il calcolo dell'incremento di peso medio per ciascuna di esse. Durante la lattazione invece,

sono stati registrati i casi di ricaduta clinica che hanno necessitato di un secondo intervento antibiotico, la mortalità, e la gravità della sintomatologia clinica per ciascuna nidiata. Per la valutazione di quest'ultimo parametro, è stato utilizzato un punteggio con scala da 0 a 2 (0 = tracce di diarrea; 1 = diarrea lieve; 2 = diarrea evidente). Al termine della prova, è stato calcolato anche il costo sostenuto per ciascun trattamento utilizzando le quotazioni commerciali medie di entrambi i prodotti antibiotici utilizzati.

RISULTATI E DISCUSSIONE

La scelta dell'antibiotico corretto da utilizzare durante una terapia può basarsi sulla sola diagnosi clinica del veterinario (terapia empirica) oppure formularsi a seguito di diagnosi di laboratorio con test di suscettibilità all'antibiotico (Guardabassi e Kruse, 2008). Chiaramente le terapie empiriche, se da un lato hanno il potenziale vantaggio di consentire un'azione immediata sulla patologia e di minimizzare morbidità, trasmissione e mortalità senza dover aspettare l'analisi del laboratorio, dall'altro non possono garantire che il patogeno non abbia sviluppato delle resistenze proprio verso l'antibiotico selezionato. Per questo, il consiglio che negli ultimi anni accomuna tutte le scelte terapeutiche, è quello di abbandonare sempre più la sola terapia empirica a favore di quella basata anche sulla conferma di laboratorio. In campo veterinario, esempi di situazioni nelle quali storicamente la scelta del trattamento antibiotico è effettuata spesso a seguito di sola diagnosi clinica sono i focolai di polmoniti di pleuropolmonite da *Actinobacillus Pleuropneumoniae* e quelli di enterite, tra cui anche neonatale da *Escherichia Coli* (Gottschalk, 2012; Pedersen et al., 2015). Tra l'altro, i trattamenti per le patologie intestinali e respiratorie sono le più comuni indicazioni antibiotiche terapeutiche nella moderna produzione suinicola (Page and Gautier, 2012; De Briyne et al., 2014; European-Commission, 2015).

Anche per questo motivo le resistenze batteriche agli antibiotici hanno portato alla riduzione dell'efficacia di alcune classi di molecole, tra cui diverse importantissime per la cura di gravi patologie nell'uomo.

I chinoloni (come anche l'enrofloxacin) sono entrati nella lista degli antibiotici di fondamentale importanza per l'uomo a seguito del secondo meeting WHO tenutosi nel 2007 (WHO expert meeting on Critically important antimicrobials for human health, Copenhagen, Denmark), perché rappresentano una delle poche armi disponibili per la cura di gravi infezioni sostenute da *Salmonella* ed *E. Coli*. Entrambe queste infezioni presentano un'alta incidenza di patologia nell'uomo, ed il ruolo dei chinoloni diventa dunque assolutamente indispensabile in campo ospedaliero. Purtroppo, è noto come questa classe di antibiotici sia in grado di selezionare resistenze proprio in *Salmonella* e *E. Coli* in campo zootecnico.

Con queste premesse, è importante sottolineare la necessità di effettuare sempre una verifica di laboratorio sulle resistenze batteriche presenti nella popolazione da trattare, soprattutto quando i trattamenti sono reiterati nel tempo. Nel caso ci sia sensibilità a più antibiotici, è consigliabile prediligere come scelta primaria un antibiotico considerato meno critico per la salute umana.

Nel confronto tra enrofloxacin e amminosidina condotto in questa prova, nessuno dei parametri raccolti ha mostrato differenze tra i due trattamenti. Il peso alla nascita è stato di 1.47 vs 1.38 kg (amminosidina vs controllo rispettivamente; $P = 0.370$), mentre il peso allo svezzamento 5.64 vs 5.23 kg ($P = 0.247$); il numero medio di suinetti svezzati per scrofa è stato 9.7 vs 9.8 ($P = 0.846$), con punteggi fecali medi di 0.9 vs 1.05 ($P = 0.418$) e numero di ritrattati a causa di ricadute pari a 6/20 vs 4/20 ($P = 0.832$). Anche considerando il costo dei trattamenti, per ciascuna nidiata è stata sostenuta una spesa simile: calcolando una media

di 12 suinetti per nidiata ed un peso medio di 2.5 kg/suinetto, la stima di costo è stata 1.037 vs 1.035€.

I risultati suggeriscono effetti simili tra le due molecole testate nel trattamento della diarrea sotto scrofa da E. Coli. Per questo motivo in caso di sensibilità riscontrata da antibiogramma per entrambi i principi attivi, andrebbe considerata la possibilità di valutare l'enrofloxacin come seconda scelta di trattamento, preservandone l'uso in condizioni di scarsa risposta ad altri antibiotici. La scelta dell'amminosidina sembra essere una buona alternativa.

È tuttavia importante sottolineare come, per quanto esistano classi di antibiotici a più alto rischio, tutti i chemioterapici vadano usati in modo responsabile, per ridurre al minimo i fenomeni di resistenza. Si consiglia dunque di valutare sempre la biosicurezza, l'igiene, la possibilità di profilassi vaccinale ed il corretto management prima di utilizzare l'antibiotico, riservandolo ai casi di terapia e non di profilassi/metafilassi.

BIBLIOGRAFIA

- De Briyne, N., Atkinson, J., Pokludova, L., Borriello, S.P., 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Veterinary Record* 175, 8.
- European-Commission, 2015. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. http://ec.europa.eu/health/antimicrobial_resistance/docs/2015_prudent_use_guidelines_en.pdf
- Gottschalk, M., 2012. Actinobacillosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), *Diseases of Swine*. John Wiley & Sons, Inc., 653-669.
- Guardabassi, L., Kruse, H., 2008. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: Guardabassi, L., Jensen, L.B., Kruse, H. (Eds.), *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell Publishing Ltd., 1-12.
- Ministero della Salute (2012). Manuale "Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia". http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1683_allegato.pdf
- Page, S.W., Gautier, P., 2012. Use of antimicrobial agents in Livestock. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 31, 145-188.
- Pedersen, K.S., Okholm, E., Johansen, M., Angen, Ø., Jorsal, S.E., Nielsen, J.P., Bækbo, P., 2015. Clinical utility and performance of sock sampling in weaner pig diarrhoea. *Prev. Vet. Med.* 120, 313–320.
- World Health Organization (2011). Critically important antimicrobials for human medicine. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77376/1/9789241504485_eng.pdf



ecuphar®

al tuo fianco, ogni giorno

Lavoriamo quotidianamente per aumentare la soddisfazione dei professionisti attraverso:

- l'ottimizzazione della gestione aziendale: più qualità e redditività
- il perseguimento del benessere e della salute degli animali



www.ecuphar.it

info@ecuphar.it

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

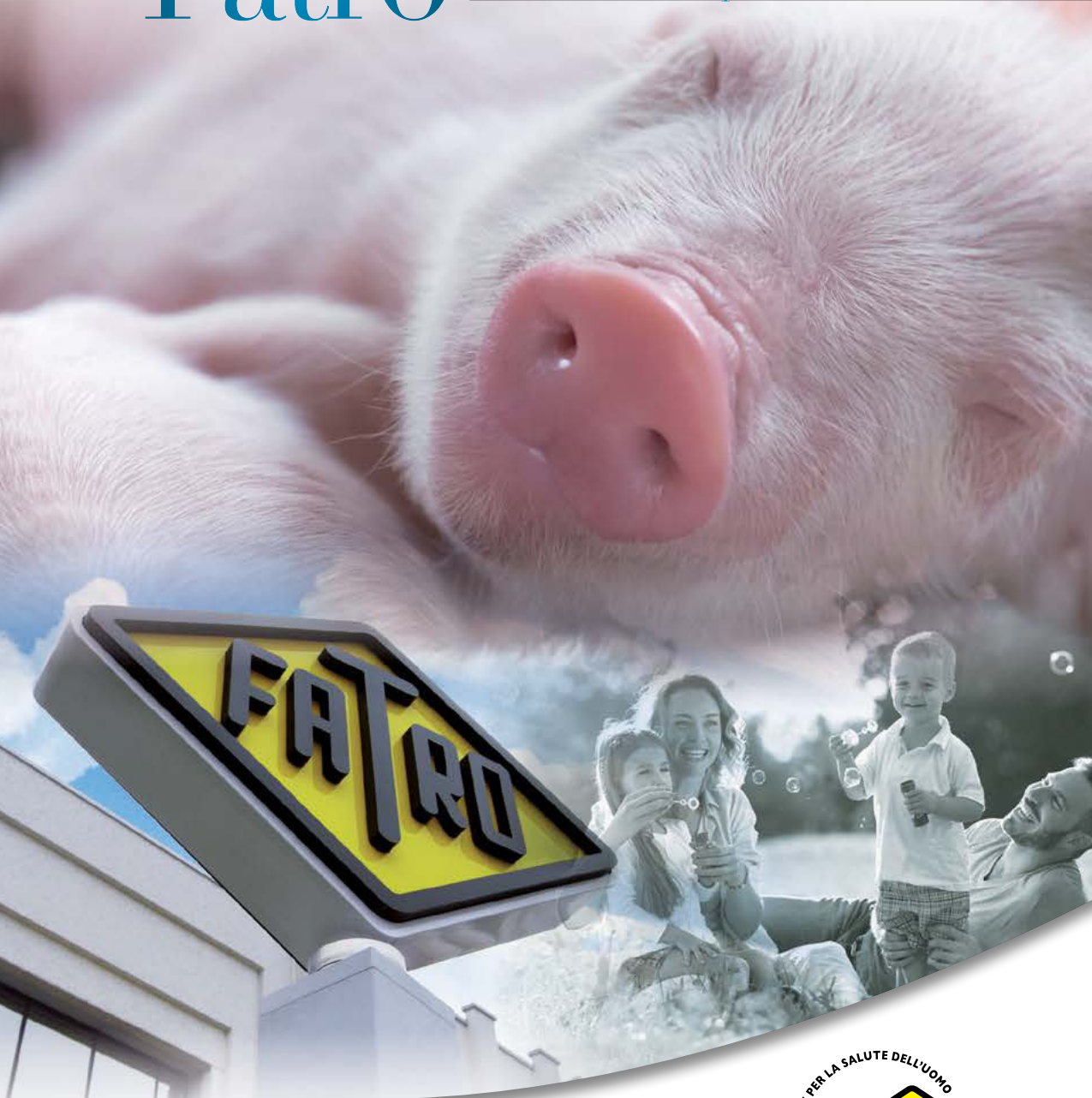
www.elanco.it e-mail: Elanco_FA_Italia@elanco.com

Elanco

cod. ITSWISTE00005(1)

Qualità e Sicurezza Fatro

la salute animale per la salute dell'uomo



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



www.huvepharma.com

Contatto per l'Italia:
Paolo Mondin: 339/7385156
paolo.mondin@huvepharma.com

HUVEPHARMA EOOD • 3^a NIKOLAY HAYTOV STR • 1113 SOFIA • **BULGARIA** • P +359 2 862 5331 • F +359 2 862 5334 • SALES@HUVEPHARMA.COM
HUVEPHARMA N.V. • UITBREIDINGSTRAAT 80 • 2600 ANTWERP • **BELGIUM** • P +32 3 288 1849 • F +32 3 289 7845 • CUSTOMERSERVICE@HUVEPHARMA.COM

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 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.

PER DEGLI ANIMALI IN BUONA SALUTE
MEGLIO ESSERE **BEN INQUADRATO**



Salute

Specialità per la terapia

Performance

Specialità nutrizionali per una produzione ottimizzata

Qalian Italia S.r.l.

+39 059 637350

contact@it.qalian.com

Qalian
ANIMAL HEALTH


LIVISTO

12 Aziende in
9 Paesi che operano con
500 dipendenti in
129 mercati con quasi
100 anni di storia

Il Gruppo **LIVISTO** è attivo nel settore della salute animale, sviluppando e commercializzando **prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità** per animali da reddito e domestici.

TREI S.p.A. è un'azienda farmaceutica italiana fondata nel 1968 con sede a Rio Saliceto (Reggio Emilia) e dal 2014 è entrata a far parte del Gruppo LIVISTO.

Lo **stabilimento produttivo di TREI** è suddiviso in tre aree:

- produzione **medicinali veterinari**
- produzione **medicinali contenenti β -lattamici**
- produzione di **integratori nutrizionali** e **mangimi complementari rumino-protetti**



I nostri prodotti:

FARMACI

Per animali da reddito e da compagnia

- Medicinali veterinari **uso orale**
- **Premiscele** per alimenti medicamentosi
- Medicinali veterinari **uso topico e iniettabile**
- Medicinali veterinari in **compresse**

NUTRIZIONE

- **Integratori** nutrizionali per ruminanti, suini, avicoli e conigli
- Tecnologia di protezione ruminale **Biopass®**
- Linea latte **Multana**
- Linea blocchi **Megalix/Megastart**
- Linea inoculi **Silierung**
- Linea cavalli **Derbymed**

IGIENE

- Linea di **disinfettanti** e **detergenti** per allevamenti, attrezzature e macelli
- Linea di prodotti per il controllo degli insetti nocivi negli allevamenti: **Mosca...Stop!**
- Prodotti **dermatologici** per animali da compagnia

Along with you

Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.
e-mail: trei@treivet.com - Tel: +39 0522 640711

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

Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS
per il 2018 si svolgono con il contributo di:

