ATTI

DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLV
MEETING ANNUALE

Rezzato (BS) - Villa Fenaroli

21-22 Marzo 2019

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2019

In copertina: If you are not too long, I will wait here for you all my life - Nicoletta Belletti
www.nicolettabelletti.com

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini
XLV Meeting Annuale, Rezzato (BS) - Villa Fenaroli - 21/22 Marzo 2019

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Marzo 2019.

ISBN 978-88-943304-0-3

INDICE

Prefazione ..... p. 17

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**IL BENESSERE ANIMALE
E IL FUTURO DELLA SUINICOLTURA**

Bologna - 27 Settembre 2018

INTERRUZIONE GRADUALE DEL TAGLIO DELLA CODA COME PROCEDURA DI ROUTINE NEGLI ALLEVAMENTI SUINI - ESPERIENZE IN GERMANIA
Blaha T. ..... p. 21

INTERROMPERE IL TAGLIO DELLA CODA: UNA DECISIONE DELICATA
Scollo A. ..... p. 25

DALL'AUDIT COMUNITARIO AD OGGI: COSA STA CAMBIANDO IN TEMA DI BENESSERE. IL RUOLO DEL VETERINARIO AZIENDALE
Vezzoli F., Maisano A.M., Borrello S., Alborali G.L. ..... p. 27

ATTI DEL XLV MEETING ANNUALE

Rezzato (BS) - Villa Fenaroli - 21/22 Marzo 2019

MISURE DI PREVENZIONE E CONTROLLO PER MINIMIZZARE IL RISCHIO DI DIFFUSIONE DEL PESTE SUINA AFRICANA NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI
Bellini S. ..... p. 35

CARATTERISTICHE DI RESISTENZA E PERSISTENZA DELLA PESTE SUINA AFRICANA
Feliziani F., Iscaro C., Petrini S., De Mia G.M. ..... p. 37

LA PESTE SUINA NEL CINGHIALE IN EUROPA
Guberti V. ..... p. 39

CONTROLLO DI *SALMONELLA* NEGLI ALLEVAMENTI SUINI NELL'ERA POST-ANTIBIOTICO
Foster N. ..... p. 41

CONTROLLO DELLA *SALMONELLA* FROM FARM TO FORK: IL PUNTO DELLA SITUAZIONE
Martelli F. ..... p. 43

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

RELAZIONI TRA QUALITÀ DEI MATERIALI DI ARRICCHIMENTO E ANIMAL BASED MEASURES NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO
Maisano A.M., Santucci G., Scali F., Giudici F., Amicabile A., Giacomini E., Lazzaro M., Tonni M., Vezzoli F., Castelluccio D., Santucci V.U., Bertocchi L., Alborali G.L. ..... p. 49

LE BASI COMPORTAMENTALI DELLA MORSICATURA DELLA CODA: RISVOLTI PRATICI NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO
Scollo A. ..... p. 57

INDAGINE SULLA PRESENZA, PREVALENZA, TIPOLOGIA, MANIFESTAZIONI CLINICHE E ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ DI STREPTOCOCCUS SUIS IN UNA FILIERA PRODUTTIVA NEGLI ANNI 2010-2018
Sandri G., Giovanardi D., Pesente P., Rossi G., Niero G. ..... p. 65

LA DETERMINAZIONE DELLA MIC COME STRUMENTO DECISIONALE NELLA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA IN AMBITO SUINICOLO
Vio D., D'este L., Gagliazzo L., Ustulin M., Tagliente D., Vicenzoni G.F. ..... p. 71

MONITORAGGIO DEL CONSUMO DI ANTIMICROBICI NEGLI ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA NEL PERIODO 2016-2017: DATI PRELIMINARI
Pangallo G., Bassi P., Motta V., Salvarani C., Luppi A., Merialdi G., Scali F., Alborali G.L., Bosi P., Trevisi P. ..... p. 77

STUDIO SULL'USO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI PER LA DIAGNOSI DI PRRS IN CONDIZIONI DI CAMPO
Ustulin M., Tonon F, Lombardo F., Giorgiutti M., Targhetta C., Toffoletto M., Vio D. ..... p. 85

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ IN VITRO DI CEPPI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* ISOLATI NEL PERIODO 2005-2018 IN ITALIA
Bonilauri P., Pangallo G., Luppi A., Gherpelli Y., De Lorenzi G., Leonelli R., Dottori M., Merialdi G. ..... p. 91

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DOPO LA SOSPENSIONE DELL'UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI
De Lucia A., Ostanello F., Smith R.P., Davies R., Card R. M., Rambaldi M., Martelli F. ..... p. 101

ACIDO LAURICO SAPONIFICATO CON IL CALCIO NELLA DIETA DI SUINETTI IN POST SVEZZAMENTO: EFFETTI SULLE PERFORMANCE DI CRESCITA E SULLA SALUTE INTESTINALE
Giorgi S., Comi M., Ghiringhelli M., Cevolani D., Bontempo V. ..... p. 109

EFFETTI SULL'ACCRESCIMENTO LEGATI ALLA SOMMINISTRAZIONE DELLA PRIMA SOLUZIONE PROTEICA ISOTONICA IN SUINETTI NELLA SALA PARTO E NELLA FASE DI PASSAGGIO ALLO SVEZZAMENTO
Tagliaferri L., Colzani A., Scollo A., Granato L., Righi F., Mazzoni C. ..... p. 117

IL PRELIEVO DALLA VENA MAMMARIA: UN NUOVO METODO DI PRELIEVO NELLE SCROFE IN LATTAZIONE PER RISPARMIARE TEMPO E LAVORO
Romano G., Scollo A., Tagliaferri L., Righi F., Bresciani C., Mazzoni C. ..... p. 123

STUDIO SUL COMPORTAMENTO DEI SUINETTI IN SALA PARTO VERSO I CUPS DURANTE LA LATTAZIONE
Romano G., Scollo A., Baldi G., Tagliaferri L., Righi F., Bresciani C., Mazzoni C. ..... p. 133

PERICARDITE FIBRINOSA AL MACELLO: PREVALENZA NEL SUINO PESANTE E RELAZIONE CON LE ALTRE LESIONI DELLA CORATA
Bottacini M., Scollo A., Contiero B., Gottardo F. ..... p. 143

ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO (ESBL) IN CINGHIALI E SUINI IN SVEZZAMENTO ED INGRASSO DECEDUTI CON E SENZA SINTOMATOLOGIA ENTERICA
Baldo V., Pitozzi A., Boniotti M.B., Salogni C., Giovannini S., Scali F., Agnoletti F., Mazzolini E., Pasquali P., Alborali G.L. ..... p. 151

PARAMETRI DI IMMUNITÀ PROTETTIVA NEL SUINO INDOTTI DA VACCINI PCV2 A DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE
Guarneri F., Amadori M., Boniotti M.B., Barbieri I., Lelli D., Tresoldi E.T. ..... p. 161

RISULTATI PRELIMINARI DI CONFRONTO TRA DIFFERENTI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI PER IL MONITORAGGIO DELLA PRRSV NEI SUINETTI SOTTOSCROFA
Tonni M., Maisano A.M., Boniotti M.B., Ostanello F., Leotti G., Scali F., Andreoni S., Alborali G.L. ..... p. 171

STUDIO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS INFLUENZALE TIPO A, B, C E D NEGLI ALLEVAMENTI SUINI NEL NORD ITALIA. CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS CIRCOLANTI NEGLI ANNI 2016-2018.
Chiapponi C., Prosperi A., Faccini S., Moreno A., Alborali G.L., Merenda M., Luppi A., Amorico A., Baioni L., Zanni I., Manfredi R., Gabbi V., Foni E. ..... p. 177

POLMONITE ENZOOTICA: MONITORAGGIO DELLE LESIONI BRONCOPOLMONARI IN SUINI MACELLATI NEL PERIODO 2012-2018
Pangallo G., Bonilauri P., De Lorenzi G., Luppi A., Dottori M. ..... p. 187

STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS
Ustulin M., Catania S., Gobbo F., Fincato A., Targhetta C., Toson M., Vio D. ..... p. 193

SORVEGLIANZA DELLA TUBERCOLOSI BOVINA NEL CINGHIALE, OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE
Gavaudan S., Conquista M., Barchiesi F., Canonico C., Angeloni G., Perugini G., Aconiti Mandolini N., Papa P., Crotti S., Mazzone P., Gaspari M., Barboni C., Morandi F. ..... p. 203

CASI CLINICI

ENTEROPATIA AD EZIOLOGIA MULTIFATTORIALE NELLO SVEZZAMENTO IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO
Di Blasio A., Marchis D., Desiato R., Millone A., Ceppa L., Barbero R., Ru G., Masoero L., Caruso C., Messina M.[1], Dondo A., Zoppi S. ..... p. 213

FOCOLAIO DI PCV2 SYSTEMIC DISEASE (PCV2-SD) IN SUINETTI PRECEDENTEMENTE VACCINATI CONTRO PCV2
Andreoni S., Invernizzi E., Lasagna C. ..... p. 217

FOCOLAIO DI PLEUROPOLMONITE FIBRINO-NECROTICO-EMORRAGICA IN UN'AZIENDA DA INGRASSO
De Lorenzi G., Barbieri G., Gherpelli Y., Pangallo G., Magistrali C.F., Gibelli L., Bonilauri P., Luppi A. ..... p. 223

LA VARABILE NUMERO SETTE: IL PESO ALLA NASCITA
Paladin G.B., Nodari M. ..... p. 229

MORSICATURA DELLA CODA IN SUINI ALLO SVEZZAMENTO
Fusco L. ..... p. 233

POSTERS

DESCRIZIONE DI UN GRAVE EPISODIO DI PASTEURELLOSI NELLE SCROFE
Marruchella G., Di Francesco C.E., Trachtman R., Mosca F., Sebastiani C., Di Provvido A., Tiscar P.G., Magistrali C. ..... p. 241

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI MELOXIDYL® 20MG/ML ALLE SCROFE NEL PERIPARTO ASSOCIATO O MENO A TRATTAMENTO ANTIBIOTICO CON LONGOCILLINA L.A.® 150mg/ml: STUDIO PRELIMINARE
Ortolan T., Pesce C., Scollo A., Romano G., Mazzoni C., Casappa P. ..... p. 247

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII* SUL CONTENUTO DI IMMUNOGLOBULINE IGG NEL COLOSTRO DELLA SCROFA
Arango F., Bazzoli A., Bravo De Laguna F., Saornil D. ..... p. 257

UTILIZZO DELLA VACCINAZIONE CONTRO LA SALMONELLA TYPHIMURIUM NEI SUINI: BREVE RASSEGNA BIBLIOGRAFICA
Schüler V. ..... p. 263

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS (APPV) IN SUINI E CINGHIALI NEL NORD ITALIA
Sozzi E., Parisio G., Faccin F., Lelli D., Salogni C., Barbieri I., Alborali G.L., Moreno A., Lavazza A. ..... p. 267

NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA: IDENTIFICAZIONE DI DUE DIVERSI GENOTIPI
Cavicchio L., Rizzo G., Cunial G., Milani A., Laconi A., Campalto M., Pagliari M., Ustulin M., Monne I., Forzan M., Vio D., Bonfanti L., Beato M.S. ..... p. 275

DIFFUSIONE DI ROTAVIRUS A E NON-A IN SUINETTI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA
Ferrari E., Busi C., Salogni C., Martella V., Giovannini S., Alborali G.L., Boniotti M.B. ..... p. 283

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2019

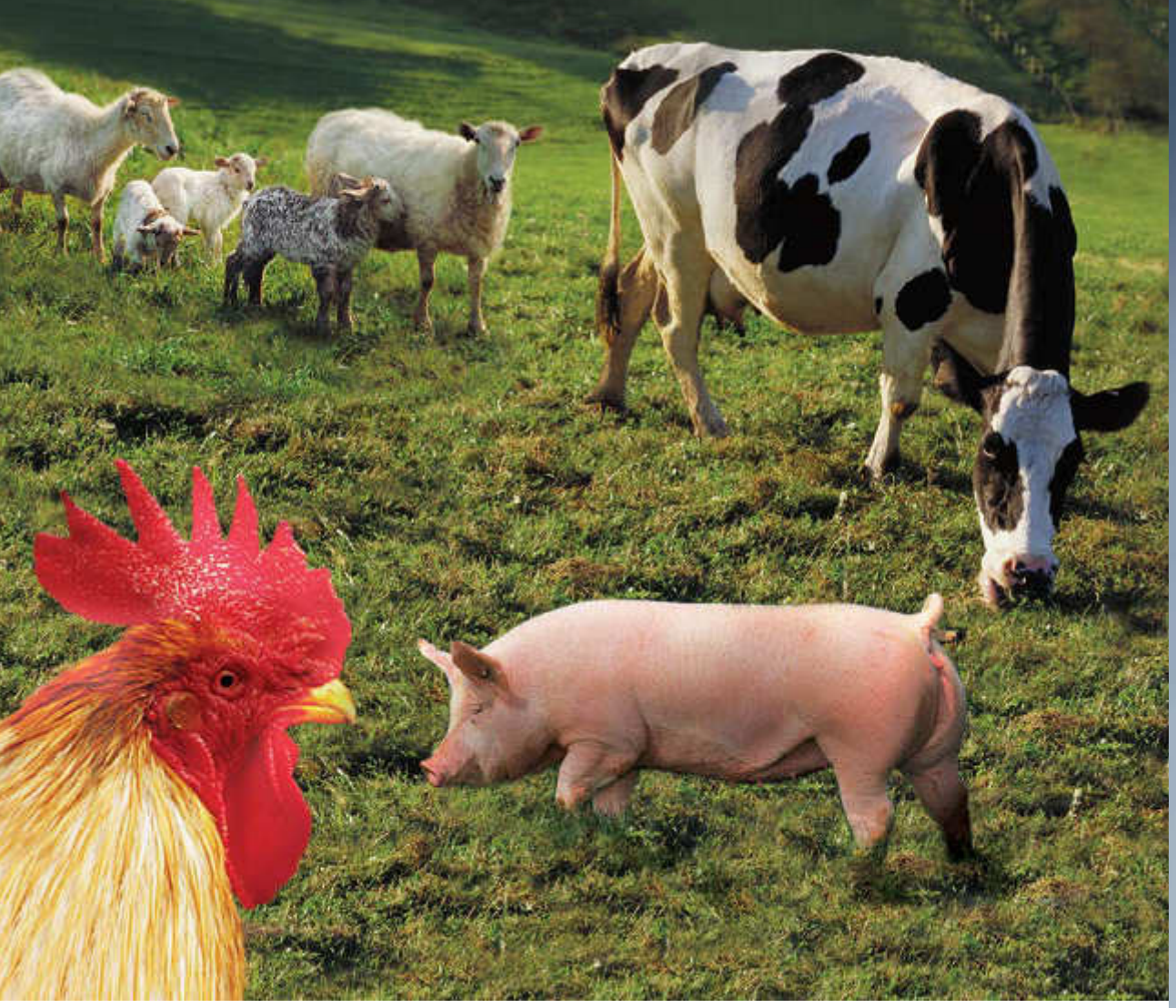
VINCITORE

CARATTERIZZAZIONE METABOLOMICA DEL COLOSTRO DI TRE RAZZE DI SCROFE E ANALISI DELLA SUA INFLUENZA SULLE PERFOMANCE DI CRESCITA E SOPPRAVVIVENZA DEI SUINETTI
Picone G., Zappaterra M. , Luise D., Trimigno A., Capozzi F., Motta V., Davoli R., Nanni Costa L., Bosi P. , Trevisi P. ..... p. 293

PREMIO GIOVANE LAUREATO 2019

PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. ISOLATI NELLA FILIERA SUINA
Torreggiani C., Prof. Brindani F., Dott.ssa Bacci C. ..... p. 303

RIDUZIONE DEL DOLORE IN SUINETTI SOTTOPOSTI A CASTRAZIONE: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN ANESTETICO LOCALE E DI UN ANTI-INFIAMMATORIO
Bolzonello M., Scollo A., Gottardo F., Contiero B., De Benedictis M.G. ..... p. 309



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

NUMEROVERDE 800-015121

www.vetclub.it

BAYER

PREVENTION WORKS

Il futuro della suinicoltura
è nelle vostre mani

Boehringer Ingelheim

UNA FINESTRA SULLE AZIENDE

CALIER
COMMITTED TO ANIMAL WELFARE

fa parte del **Gruppo Indukern**, multinazionale spagnola a conduzione familiare. **Calier è un'azienda farmaceutica veterinaria**, fondata nel 1968, e si occupa della **ricerca, sviluppo, produzione e commercializzazione** di prodotti per il benessere animale.

Il Gruppo Indukern

INDUKERN
Materie Prime

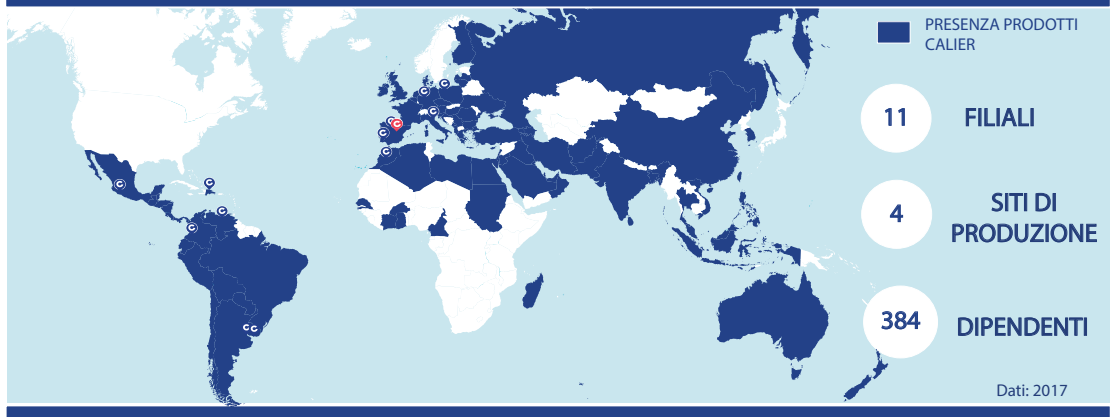
CALIER
Linea Veterinaria

KERN PHARMA
Linea Umana

La filosofia di Calier è rappresentata dal nostro slogan **" Committed to animal welfare "**, infatti crediamo che, al fine di migliorare la salute e il benessere delle persone, dobbiamo concentrare tutti i nostri sforzi nel garantire che i nostri prodotti e servizi assicurino la salute e il benessere animale; questo è il nostro impegno.

CALIER NEL MONDO

Calier è presente attraverso le sue filiali in Europa e America Latina e continua la sua espansione mediante una crescita organica e per acquisizioni.



CALIER ITALIA

In Italia siamo presenti dal 2008, ogni giorno ci impegnamo nel garantire il benessere animale attraverso le nostre linee di prodotti:

ANIMALI DA REDDITO

- -Antibiotici
- -Antinfiammatori
- -Antimastitici
- -Antiparassitari
- -Ormonali
- -Mangimi complementari

ANIMALI DA COMPAGNIA

- -Anestetici
- -Antibiotici
- -Antinfiammatori
- -Antiparassitari
- -Cardiologici
- -Dermatologici

EQUINI

- -Anestetici
- -Antinfiammatori
- -Mangimi complementari
- -Ormonali

Calier Italia Srl - Via Morozzo della Rocca 3, 20123 Milano - Tel 3319744978 - info@calier .it - www.calier.it

Un nuovo punto di riferimento per il futuro....

Materiale riservato al Sig. Medici Veterinari e Farmacisti.

ÂÀ LES POINTS SUR LES A - Photo Credit : Getty Images / Photo and Co

Un range sempre più completo al tuo fianco:

Vaccini contro la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino, il Mal Rossino, la Parvovirosi del suino, la malattia associata al Circovirus, la Pleuropolmonite del suino e la Polmonite Enzootica

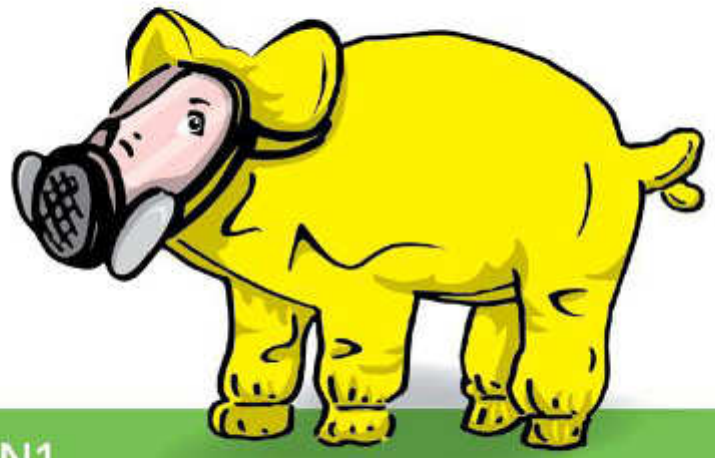
Together, beyond animal health

ceva

IDT

chemifarma
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA

Mi vuoi veramente "influenza...re" ?



Respiporc FLUpan H1N1

Curiamo ben più della salute animale

Il primo vaccino europeo registrato per l'influenza pandemica

- **Riduce la carica virale polmonare**
- **Riduce l'escrezione virale**

Flacone in PET da
25 ml (25 dosi)
NIN: 105306017

Distributore Esclusivo per ITALIA: **CHEMIFARMA S.p.A.** - Via Don Eugenio Servadei, 16 - 47122 Forlì (FC) - ITALY
tel. +39 **0543 796464** - fax +39 0543 796479 - e-mail: info@chemifarma.it - **www.chemifarma.it**

IDT Biologika Am Pharmapark 06861 Dessau-Rosslau, Germany +49 34901 885 5000 www.idt-animal-health.com

RESPIPORC FLUpan H1N1 sospensione iniettabile per suini **Composizione:** Ogni dose da 1 ml contiene: Principio attivo: Virus dell'influenza A inattivato/umano. Ceppo: A/Jena/VIS258/2009(H1N1)pdm09 16-64. UE 1 UE – unità emoagglutinanti nel vaccino. Adiuvante: Carbomer 971 PNF 2 mg. Eccipiente: Tiomersale 0,1 mg. **Indicazioni:** Immunizzazione attiva di suini di età superiore a 8 settimane nei confronti del virus dell'influenza suina pandemica H1N1 per ridurre la carica virale polmonare e l'escrezione virale. Inizio dell'immunità: 7 giorni dopo la vaccinazione primaria. Durata dell'immunità: 3 mesi dopo la vaccinazione primaria. **Controindicazioni:** Nessuna. **Reazioni avverse:** Un aumento transitorio della temperatura rettale, non superiore a 2°C, è comune dopo la vaccinazione e non persiste per più di un giorno. Può verificarsi un gonfiore transitorio di dimensioni fino a 2 cm in sede di iniezione; tale reazione è comune ma si risolve entro 5 giorni. **Tempo di attesa:** Zero giorni. Medicinale veterinario soggetto a prescrizione. **Marketing Authorisation Holder:** IDT Biologika GmbH, Am Pharmapark, 06861 Dessau-Rosslau, Germany.

Sinergie per un perfetto equilibrio

Sappiamo curare una malattia, prima che si manifesti. Perché conosciamo l'importanza dell'alimentazione e della prevenzione, alleate preziose per ridurre l'uso di farmaci.
Una competenza unica, che ci permette di sviluppare

✓ prodotti nutrizionali tecnologici e funzionali
✓ prodotti per la disinfezione e per la lotta alle micotossine
✓ prodotti farmaceutici efficaci, per quando davvero serve medicare.

Per aiutarti nell'avere cura, che è molto più che curare..

DOX-AL ITALIA S.p.A.
Via Mascagni, 6 - 20884 Sulbiate (MB) Italy
Tel. +39 039 62051 - Fax +39 039 6205400
www.doxal.com

dox-al Nutri | dox-al Pharma | dox-al Hi-tech

PREFAZIONE

Cari colleghi,

è con vivo piacere che vi do il benvenuto, a nome di tutto il Consiglio Direttivo, al 45° Meeting Annuale della SIPAS. Non ho dubbi sul fatto che anche questa volta sarete numerosi e che la vostra partecipazione sarà attenta e vivace.
Come Consiglio Direttivo, crediamo fermamente che uno dei punti di forza della SIPAS sia rappresentato dall'alto livello di coinvolgimento dei suoi soci nelle attività del Meeting annuale, testimoniato dal numero consistente di comunicazioni e dal loro altro valore scientifico e formativo.
Negli ultimi anni la SIPAS ha perseguito almeno 3 obiettivi principali: a) mantenere al più alto livello possibile le attività di formazione/informazione rivolte ai soci; b) finanziare direttamente o indirettamente (mediante l'attribuzione di premi) alcune attività di formazione rivolte in modo mirato ai giovani laureati; c) accreditarsi, come Società scientifica, presso il Ministero della Salute in modo da poter garantire forme di consultazione per quanto riguarda la sanità animale.
Ci siamo riusciti? Come membro del Consiglio Direttivo non posso esprimere un giudizio. Come Socio voglio però esprimere un mio parere personale.
Nel panorama delle società scientifiche veterinarie italiane la SIPAS ha alcune importanti peculiarità: al suo interno sono presenti professionalità estremamente diversificate tra di loro (liberi professionisti, mangimisti, IZS, Università, ecc.) che da molti anni contribuiscono a mantenere elevata la qualità delle attività formative della Società (Meeting annuali, Giornate di studio) creando una "rete" di conoscenze molto importanti in termini professionali.
Il finanziamento di alcune attività di formazione rivolte, in modo mirato, ai giovani laureati è un investimento che la Società ha fatto da molti anni per "arruolare" giovani colleghi con lo scopo di garantire loro la possibilità di fare significative esperienze di formazione da una parte e, dall'altra, permettere un ritorno di conoscenze nell'ambito della SIPAS. Non ho dubbi sull'efficacia di questo tipo di attività; ho solo qualche perplessità in merito al numero relativamente scarso di domande di partecipazione da parte dei giovani laureati. Forse il prossimo Consiglio Direttivo, con il contributo dei soci dovrà sperimentare nuove strategie di coinvolgimento.
Ritengo inoltre che l'accreditamento presso il Ministero della Salute abbia rappresentato un traguardo importante e non scontato che consentirà alla SIPAS di "far sentire" la propria voce in merito a problematiche normative e tecniche che coinvolgono il mondo della suinicoltura.
Concedetemi una considerazione finale: come sapete quest'anno 5 dei 7 componenti dell'attuale Consiglio Direttivo decadranno e non potranno essere rieletti. In qualche modo si chiude un ciclo ma sono certo che i Soci saranno in grado di scegliere i nuovi componenti in modo da garantire, come già successo in precedenza, che la SIPAS continui a svolgere efficacemente le proprie attività.
Da ultimo, 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.
Un sentito ringraziamento anche a tutti i Soci a cui chiediamo una partecipazione sempre più attiva alla vita della Società.

Fabio Ostanello

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

IL BENESSERE ANIMALE
E IL FUTURO DELLA SUINICOLTURA

Bologna - 27 Settembre 2018

INTERRUZIONE GRADUALE DEL TAGLIO DELLA CODA COME PROCEDURA DI ROUTINE NEGLI ALLEVAMENTI SUINI - ESPERIENZE IN GERMANIA

BLAHA T.

Professore di Epidemiologia, Dipl. ECVPH e ECPHM
Presidente dell'Associazione Veterinaria Tedesca per il benessere animale

INTRODUZIONE

Il taglio della coda è stato introdotto 50-60 anni fa in tutti i paesi, contemporaneamente all'intensificazione della produzione suina. L'allevamento dei maiali confinato, in box, per fascia di età e senza lettiera in paglia, ha fatto aumentare in modo evidente il fenomeno della morsicatura della coda. Il morso stesso, insieme alle infezioni secondarie innescate dal morso (spesso con ascessi ascendenti alla colonna vertebrale) significano sofferenza per gli animali. I produttori di suini scoprirono presto che il taglio delle code ne riduceva notevolmente la morsicatura. Ad oggi quattro generazioni di allevatori hanno tagliato la coda regolarmente in tutti i suinetti, e non hanno mai allevato maiali con la coda intatta, identificando il taglio della coda come una misura di benessere animale, poiché impedisce la sofferenza agli animali.

Questa lecture si propone di spiegare perché sia inevitabile ridurre drasticamente la frequenza della morsicatura della coda nei maiali e perché sia necessario abbandonare gradualmente, preferibilmente in modo volontario, la routine del taglio della coda, viste le crescenti richieste delle ONG e sempre più, della società in generale. Vengono inoltre riassunte le diverse conoscenze ed esperienze raccolte in quei paesi che hanno già abbandonato il taglio coda, e quelle ottenute dagli oltre 30 progetti scientifici e pilota in Germania che hanno valutato come allevare maiali con code intatte senza che aumenti la frequenza della morsicatura. Le conclusioni tratte forniscono una base per una strategia di implementazione graduale di misure specifiche di allevamento che consentano di allevare suini con code intatte, nei quali la morsicatura della coda sia un evento raro (Blaha & Holling, 2016).

Le informazioni pratiche che vengono fornite, si basano sulle esperienze ottenute in corso di iniziative regionali in Germania per eliminare gradualmente il taglio della coda di routine a partire da pochi allevamenti disposti a: iniziare con piccoli gruppi di maiali con la coda intatta; imparare ad osservare gli animali più intensamente ed evitare la morsicatura della coda attuando misure appropriate.

Perché interrompere il taglio della coda

Ci sono due ragioni principali per cui è assolutamente necessario interrompere il taglio della coda nei maiali come routine generale: 1. La legislazione europea (Direttiva UE 2008/120/CE) consente l'amputazione solo se sono presenti forti giustificazioni, come ragioni mediche o rischi elevati per la salute degli animali stessi o di altri individui, e 2. Sempre più persone pensano che sia immorale togliere agli animali la loro integrità fisica, mentale e sociale (Taylor et al., 2010).

È necessario riconoscere che il taglio della coda non è solo una compromissione dell'integrità fisica degli animali, ma è anche la perdita della possibilità di comunicazione sociale all'interno del gruppo: la coda del maiale "dice" ai compagni di box molto sullo stato mentale dell'animale. Gli scienziati olandesi hanno coniato il termine "coda parlante" (Zonderland et al., 2009). Di conseguenza, il taglio di routine della coda viola regolarmente

principi legali e morali. Inoltre, ci sono paesi (Norvegia, Svezia, Finlandia e Svizzera) che hanno abbandonato il taglio della coda come pratica di routine diversi anni fa, con tassi di morsicatura della coda che non sono superiori a quelli dei paesi in cui il taglio della coda viene ancora praticato. Per riguadagnare il consenso alla produzione intensiva di maiali da parte della società moderna è necessario essere in grado di trovare modi alternativi al taglio per prevenire la morsicatura della coda.

Cause della morsicatura della coda

La morsicatura della coda nei maiali è un processo multifattoriale: ogni bisogno fisico, mentale e / o sociale degli animali soddisfatto in modo non ottimale porta a frustrazioni e può portare a morsicatura nei suini allevati in box. Le principali carenze che provocano la morsicatura sono: alimentazione e / o approvvigionamento idrico insufficienti, pochi punti/ spazio di alimentazione, che provocano competizione per il cibo, temperatura e qualità dell'aria inadeguate, scarsa separazione nei box delle diverse aree per mangiare e bere, defecare e urinare, riposare e dormire, assenza di materiali di arricchimento, assenza di spazio per sfuggire compagni di box dominanti e aggressivi, noia dopo aver mangiato la razione giornaliera concentrata in solo uno o due pasti (considerando che i cinghiali passano il 70% del loro tempo da svegli a cercare cibo (Ursinus et al., 2014)). Inoltre, qualsiasi malattia abbassa la soglia per l'insorgenza della morsicatura (Hunter et al., 1999; Valros et al., 2004), aumentando il numero di potenziali fattori scatenanti del fenomeno. Va detto che molti dei fattori scatenanti dei focolai di morsicatura non possono essere semplicemente riconosciuti dall'osservazione clinica di un allevamento, ma possono essere identificati solo quando i test di laboratorio (analisi di mangimi e acqua, risultati sierologici e microbiologici ecc.) confermano la presenza di fattori di rischio in un determinato allevamento. In altre parole, sebbene vi siano molte conoscenze sulle cause della morsicatura della coda, non esiste un "proiettile d'argento" per la prevenzione della morsicatura, ma sono possibili solo soluzioni specifiche per l'azienda (Madey, 2014; Puetz, 2014; Holling et al., 2016). Infine, è ovvio che la tecnologia e l'automazione (in particolare l'alimentazione e la ventilazione) nel moderno allevamento hanno portato ad una riduzione significativa del tempo che gli allevatori passano nel proprio allevamento, il che si traduce in minor tempo speso nell'osservazione e nella cura diretta degli animali. Il risultato è che in molti casi i segni di insorgenza precoce della morsicatura della coda (agitazione degli animali, alcuni maiali che maltrattano altri compagni di box, code non arricciate, primi sanguinamenti in alcune code del box, ecc.) non vengono identificati e non viene attuata nessuna misura immediata per prevenire/interrompere il fenomeno.

Misure di intervento

Le molteplici cause di morsicatura della coda nei suini spiegano di fatto che, normalmente, in ogni allevamento è sempre presente una combinazione di diversi fattori per cui i maiali iniziano a mordersi la coda. Di conseguenza, solo piani strategici su misura per il singolo allevamento sono in grado di controllare in modo efficacie il complesso di cause presenti in quella determinata azienda.

Tuttavia, dovrebbero essere applicate alcune misure generali per prevenire la morsicatura nei maiali con code intatte.

1. Riorganizzare il lavoro aziendale in modo che sia possibile intensificare l'osservazione del comportamento degli animali e la cura degli animali stessi (separando i suini morsicatori e morsi, trattando i maiali feriti);
2. Fornire il materiale di arricchimento/manipolazione quotidiano nei box (paglia, fieno, carta, torba, ecc.);

3. Fornire spazio extra, per la separazione degli animali, se necessario;
4. Analizzare le potenziali carenze nel soddisfare i bisogni fisici, mentali e sociali degli animali;
5. Iniziare ad allevare maiali con code intatte solo in alcuni gruppi di maiali per verificare se tutte le misure sono state implementate con successo e per testare se ci sono ancora dei fattori che portano alla morsicatura - iniziare ad allevare tutti i maiali con code intatte solo dopo che non ci sono morsicature nei gruppi test;
6. Addestrare gli operatori all'osservazione degli animali per riconoscere i "segnali dei maiali", in particolare il movimento delle code (Zonderland et al., 2011) come sistema di allerta precoce per l'adozione di misure preventive (ad esempio trasferimento di animali morsicatori in recinti dove questi animali non dominano più i loro compagni di box).

Suggerimenti per strategie di interruzione graduale del taglio della coda a livello regionale

È ingenuo credere che sia possibile abbandonare il taglio della coda nel maiale semplicemente imponendo una scadenza, senza prevedere una procedura graduale in base alla quale gli allevamenti di una regione o di uno stato vengano guidati e formati gradualmente per accettare e imparare ad astenersi da questa procedura di amputazione.

I tre principali passaggi per eliminare gradualmente il taglio della coda su scala regionale sono:

1. Convincere gli allevatori che il taglio della coda NON è più un metodo accettato per evitare che i maiali possano soffrire e ferirsi a causa della morsicatura della coda. Quindi, è necessario concedere un periodo di transizione sufficiente, ma assicurarsi che il tempo di transizione sia utilizzato per l'apprendimento e l'allenamento su come allevare i maiali con code intatte, senza aumentare la frequenza di morsicature;
2. Trovare alcuni allevatori proattivi che siano disposti a prendere le misure necessarie per allevare maiali con code intatte. Fare in modo che le loro esperienze siano distribuite a un numero sempre maggiore di allevatori della stessa zona/regione ecc.;
3. All'inizio, per promuovere il processo di eliminazione progressiva della procedura, è consigliabile prevedere un incentivo per quegli allevatori che riescono ad allevare più del 95% dei suini con code intatte.

BIBLIOGRAFIA

1. Blaha, Th. and Holling, C. (2016): Present knowledge about and experiences with tail biting in pigs: Recommendations for phasing out routine tail docking. Berl. Muench. Tieraerztl. Wochenschr. accepted and in press
2. Holling, C., Toelle, K.H., Otto, G. and Blaha Th (2016): Haltung von Schweinen mit nicht kupierten Schwänzen in konventionellen Betrieben – eine Machbarkeitsstudie. Tierärztliche Praxis, Ausgabe Grosstiere. Accepted and in press
3. Hunter, E.J., Jones, T.A., Guise, H.J., Penny, R.H. and Hoste, S. (1999): Tail biting in pigs 1: the prevalence at six UK abattoirs and the relationship of tail biting with docking, sex and other carcass damage. Pig J. 43: 18-32
4. Madey, D.P. (2014): Evaluation of a software–based intervention tool for the reduction of tail biting in German fattening pigs [Dissertation]: University of Veterinary Medicine Hannover
5. Puetz S (2014): Entwicklung und Validierung von praxistauglichen Maßnahmen zum

Verzicht des routinemäßigen Schwänzekupierens beim Schwein in der konventionellen Mast. Dissertation, Georg-August-Universität Goettingen.
6. Sonoda, L.T., Fels, M., Oczak, M., Vranken, E., Ismayilova, G., Guarino, M., Viazzi, S., Bahr, C., Berckmans, D. and Hartung, J. (2013): Tail biting in pigs - causes and management intervention strategies to reduce the behavioural disorder. A review. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 126: 104-112.
7. Taylor, N.R., Main, D.C., Mendl, M. and Edwards, S.A. (2010): Tail-biting: a new perspective. Vet. J. 186: 137-147
8. Ursinus, W.W., Van Reenen, C.G., Kemp, B. Bolhuis, J.E. (2014): Tail biting behaviour and tail damage in pigs and the relationship with general behaviour: Predicting the inevitable? Appl. Anim. Behav. Sci 156: 22-36.
9. Valros, A., Ahlstrom, S., Rintala, H., Hakkinen, T. and Saloniemi, H. (2004): The prevalence of tail damage in slaughter pigs in Finland and associations to carcass condemnations. Acta Agric Scand Sect A - Anim Sci 54: 213-219.
10. Zonderland, J.J., van Riel, J.W., Bracke, M.B.M., Kemp, B., den Hartog, L.A., Spoolder, H.A.M. (2009): Tail posture predicts tail damage among weaned piglets. Appl. Anim. Behav. Sci. 121: 165-170
11. Zonderland, J.J., Schepers. F., Bracke, M.B.M., den Hartog, L.A., Kemp, B. and Spoolder, H.A.M. (2011): Characteristics of biter and victim piglets apparent before a tail-biting outbreak. Int. J. Anim. Biosci. 5: 767-775.

INTERROMPERE IL TAGLIO DELLA CODA: UNA DECISIONE DELICATA

SCOLLO A., DVM, PhD
scollo@suivet.it

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. Per questo motivo, storicamente la coda del sino 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. 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.

I primi tentativi difficili e controproducenti

Scegliere di non tagliare più la coda può sembrare una scelta estremamente coraggiosa in quanto chi ha effettuato senza pianificare nei minimi dettagli i primi tentativi negli scorsi anni si è trovato in forte difficoltà. Alcune aziende alla prima esperienza con animali a coda lunga, hanno infatti visto insorgere problemi di morsicatura della coda già a circa 15 kg di peso. Problemi che si esacerbavano e perduravano fino allo spostamento degli animali in magronaggio, per poi esaurirsi nell'arco di poco tempo. All'insorgenza del problema, in breve tempo si osservava il moltiplicarsi di lesioni alla coda, fino ad arrivare a prevalenze di poco inferiori al 30% animali con ferite gravi caratterizzate da sangue e croste, evidenti infezioni ed in molti casi la perdita di ingenti quantità di tessuto che determinava la riduzione in lunghezza della coda. La distribuzione del fenomeno sembrava assolutamente casuale nelle diverse stanze e nei diversi box. Molto spesso accadeva che nella stessa stanza, tra due box adiacenti e apparentemente identici tra loro, uno presentasse il problema con gravissima intensità mentre l'altro no. Ad una prima analisi, i parametri produttivi (mortalità, incremento di peso, resa) dello svezzamento erano rimasti invariati dall'evento di morsicatura, se non per un lieve aumento dei costi legati al trattamento antibiotico inevitabilmente associato alla presenza delle lesioni. Tuttavia, sebbene il fenomeno spesso si risolvesse con lo spostamento degli animali nel magronaggio, delle perdite più evidenti si presentavano proprio

nelle fasi di magronaggio ed ingrasso. In particolare, la mortalità media di queste ultime due fasi di accrescimento si alzò in alcuni siti di +2,5% a causa di animali che, anche a distanza di settimane dall'evento di morsicatura acuto, avevano mostrato mieliti ed infezioni ascendenti lungo la colonna vertebrale tale da avere compromessa la deambulazione, da parziale fino a totale. Oltre agli animali che, per questo motivo, non era stato possibile caricare sul camion per il trasporto verso il macello, anche animali macellati clinicamente sani e senza alcun segno apparente mostrarono ascessi lungo la colonna vertebrale tali da richiedere la rifilatura anche di importanti parti della carcassa.

Interventi volti alla ricerca di soluzioni senza il taglio della coda

Sebbene i fattori da controllare i migliorare siano molteplici (ventilazione, alimentazione, densità, accesso alle risorse ecc), i due fattori principali che hanno accomunato le diverse esperienze nelle diverse aziende sono state certamente la tipologia degli arricchimenti ambientali e la formazione del personale.

Gli arricchimenti ambientali sono un aspetto così importante nella gestione degli animali a coda lunga da essere stati oggetto di uno specifico report EFSA nel 2016 (*Best practices with a view to the prevention of routine tail-docking and the provision of enrichment materials to pigs*, disponibile on-line). Il tronchetto con la catena, ovvero l'arricchimento più spesso presente nelle condizioni di allevamento convenzionale, è considerato subottimale per il suino in quanto è solo parzialmente edibile (commestibile) e non è investigabile (il suino non può esprimere il suo comportamento naturale di grufolare). Le aziende che hanno continuato ad allevare suini a coda lunga si sono dovute adattare ad arricchimenti ambientali di ben più difficile gestione purtroppo, ma con il vantaggio di aver così ridotto drasticamente la percentuale di suini che presentava forme di cannibalismo. Tra gli arricchimenti migliori sembrano esserci la corda e la paglia. Entrambi hanno la necessità di essere riposizionati molto spesso, e se da un lato la corda richiede molto tempo per essere sostituita con sistema di aggancio a perni molto resistenti, la paglia ha la controindicazione del rischio di intasamento dei grigliati. Diverse aziende hanno per esempio deciso di fornire a tutti gli animali della paglia all'interno di una rastrelliera di metallo agganciata al muro o appesa al centro del box, rendendola disponibile sempre. Per ridurre il rischio di intasamento del grigliato e dei sistemi di allontanamento dei reflui, e per garantire l'investigabilità della paglia caduta a terra, sotto la rastrelliera hanno posizionato un tappetino fissato al suolo.

Come secondo aspetto in comune alla maggior parte delle aziende coinvolte nella gestione di un problema di morsicatura, la formazione del personale si è dimostrata fondamentale. Infatti, nel caso di cannibalismo della coda, diventa di vitale importanza imparare a riconoscere il morsicatore il più precocemente possibile per isolarlo dal gruppo. Solitamente il fenomeno di morsicatura inizia con un unico animale più nervoso che aggredisce per primo. Se si riesce a bloccare immediatamente questo animale, spesso la situazione si argina da sola. Diversamente, se il numero e la gravità di lesioni alla coda nel box aumenta, anche altri animali iniziano a morsicare, sia perché attratti dal sangue vivo sulle code sia per imitazione dei compagni. Il personale acquisisce dunque un'importanza ancor maggiore del normale nella prevenzione, e deve diventare anche uno scrupoloso osservatore. Chiaramente gli aspetti di formazione non devono mai rappresentare una-tantum bensì un percorso di formazione continua che si consolida con l'applicazione sul campo dell'osservazione comportamentale degli animali.

CONCLUSIONI

È indubbio che allevare suini con la coda lunga è più delicato di allevare suini a coda tagliata. Tuttavia gli accorgimenti che si possono mettere in atto per ottenere un buon risultato esistono, seppur applicabili con un maggiore sforzo di tempo e risorse in azienda. Purtroppo nessun protocollo può essere applicato indifferentemente in tutte le aziende con garanzia di riuscita, bensì ogni azienda deve trovare i suoi fattori critici e provare a porvi rimedio ma, per quanto più tecnico e delicato, l'allevamento del suino a coda lunga è possibile.

DALL'AUDIT COMUNITARIO AD OGGI: COSA STA CAMBIANDO IN TEMA DI BENESSERE. IL RUOLO DEL VETERINARIO AZIENDALE

VEZZOLI F.[1], MAISANO A.M.[1], BORRELLO S.[2], ALBORALI G.L.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna
[2]Ministero della Salute

INTRODUZIONE – Nel novembre 2017 in Italia è stato effettuato un audit comunitario nell'ambito di un progetto della Commissione inteso a migliorare l'attuazione e l'applicazione della direttiva 2008/120/CE, che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini nell'UE. L'obiettivo dell'audit consisteva nel valutare l'adeguatezza e l'efficacia delle misure in atto per prevenire la morsicatura della coda ed evitarne il mozzamento come operazione di routine nei suini. I risultati dell'audit hanno evidenziato che le autorità italiane non hanno adottato provvedimenti efficaci per far rispettare le disposizioni della direttiva in materia di prevenzione della morsicatura della coda e del mozzamento della stessa come operazione di routine nei suini. A seguito di questo audit il Ministero della Salute in collaborazione con CReNBA e IZSLER ha predisposto un Piano di Azione Nazionale per il miglioramento dell'applicazione del Decreto Legislativo 122/2011 (Direttiva 2008/120/CE) e del Decreto Legislativo 146/2001 (Direttiva 98/58/CE): misure particolari finalizzate alla prevenzione del ricorso al taglio delle code e ad assicurare la disponibilità del materiale di arricchimento ambientale.

Il mozzamento della coda non deve essere eseguito di routine, ma solo quando vi sono evidenze di una frequenza inaccettabile di lesioni alle code e/o alle orecchie dei maiali. Al fine di prevenire i focolai di morsicatura, prima di ricorrere al mozzamento della coda, si devono adottare misure intese ad evitare le morsicature delle code e altri comportamenti anormali tenendo conto delle condizioni ambientali e della densità degli animali. Risulta pertanto necessario modificare le condizioni ambientali o sistemi di gestione inadeguati (Direttiva 2008/120/CE). Il veterinario Aziendale formalmente incaricato dall'allevatore ha un ruolo fondamentale nell'applicazione del piano e ha accelerato i lavori di messa a punto del Sistema ClassyFarm per i servizi veterinari. Il veterinario aziendale rientra in un sistema multi fonte di ausilio all'epidemiosorveglianza per la gestione della Sanità Pubblica nell'ottica ONE-HEALTH. Il Sistema ClassyFarm del Ministero della Salute è lo strumento a disposizione sia del veterinario aziendale che del veterinario ufficiale che permette la gestione, dal punto di vista sanitario, delle aziende agricole. Il sistema, grazie alla logica di business intelligence, riesce a intrecciare tutti i dati salienti raccolti nei vari step della produzione e dei controlli. Questo permette alla singola realtà di poter verificare tramite i vari parametri il livello di rischio per ogni singolo indicatore (es. consumo del farmaco, benessere, biosicurezza, dati relativi alla macellazione). Mentre, a livello ufficiale permette un'accurata gestione del territorio per ogni singola tematica.

Piano Nazionale

OBIETTIVI – Tre obiettivi principali:

1. **Allevamento di maiali senza l'uso sistematico del mozzamento della coda**(obiettivo a lungo termine)
2. Individuare, per ciascuna azienda agricola, **strategie ottimali** per ridurre il rischio di morsicatura della coda (obiettivo a breve e medio termine)
3. Dimostrare, quando necessario, l'esigenza di una **deroga temporanea** per il riscorso al mozzamento della coda usando un approccio medico-tecnico-scientifico (obiettivo a breve termine)

STRATEGIA – Piano Nazionale tre-step:

1. **Valutazione del rischio** per la prevenzione del taglio della coda (Entro **dicembre 2018**): **Fotografia** dell'allevamento e **identificazione** dei ***punti critici***; **obbligatoria** per tutti gli allevamenti che possiedono settori di **svezzamento e/o ingrasso**
    a. Pianificazione dei **miglioramenti strutturali** e **gestionali**
    b. **Valutazione** approfondita dei punti critici
        i. Aspetto **Economico**: Proprietario
        ii. Aspetto **Gestionale**: Detentore
        iii. Aspetto **Tecnico**: Veterinario Aziendale
    c. **Priorità e cronoprogramma**

2. **Verificare** la possibilità e la **fattibilità** di **allevare suini a coda integra** (da **01 gennaio 2019**)
    a. **Tutti** i ***punti critici*** riscontrati nella valutazione del rischio dovranno essere **migliorati** e almeno configurati come **MIGLIORABILE**
    b. Predisporre in tutti gli allevamenti **gruppi** di animali con **coda integra** e valutarne l'andamento
    c. Le eventuali **certificazioni** comprovanti la necessità del taglio della coda dovranno essere **accompagnate** dalla documentazione attestante la **valutazione del rischio** (**Report**), con descrizione degli **interventi adottati** per risolvere i **punti critici** (**Relazione**)

3. **Verificare** la possibilità e la **fattibilità** di **interrompere** la pratica del **mozzamento** della coda
    a. Graduale **implementazione** di più **gruppi** di suini a **coda integra** fino ad arrivare all'intero **allevamento**
    b. **Valutare** l'andamento dei **gruppi** e **predisporre** eventuali **ulteriori misure** a supporto in caso episodi di morsicatura (passare dal livello **MIGLIORABILE** all'**OTTIMALE**)
    c. Implicazioni per le **scrofaie** (**Certificazioni temporanee** sulla base dell'analisi del rischio proveniente dai siti 2,3)
    d. **Allevamenti problema:** qualora in un allevamento siano soddisfatti **tutti i criteri** nella categoria **OTTIMALE** (compresa la **densità ottimale** in caso di problema reiterato presente sul manuale) e risulti ancora giustificato il ricorso al taglio della coda, occorre concordare con l'**autorità competente** le successive azioni.

VALUTAZIONE DEL RISCHIO – Complessivamente, sono stati identificati 21 criteri per affrontare i sei punti chiave della raccomandazione UE 2016/336. Questi 21 criteri sono stati raggruppati in tre macroaree: (a) strutture e attrezzature, (b) management aziendale e (c) misure basate sugli animali (ABM). Nello specifico, i criteri sono stati classificati come segue in Tab.1.

Tab. 1 – Punti chiave della Raccomandazione EU 2016/336 e relativa suddivisione dei criteri della valutazione del rischio per macroaree

Punti chiave (EU 2016/336) A - Strutture e attrezzature		**Criteri**		
		B – Management aziendale	**C - ABMs**	
1	*Materiale di arricchimento*	- Qualità del materiali di arricchimento		- Quantità del materiali di arricchimento
2	*Condizioni strutturali e di pulizia*	- Pulizia e comfort dell'area di decubito		- Pulizia degli animali
3	*Comfort termico e qualità dell'aria*	- Livelli di gas nocivi - Temperatura, umidità relativa e polverosità	- Numero di misurazioni di gas nocivi (durante il precedente anno)	
4	*Stato di salute*	- Infermeria	- Numero di addetti - Formazione degli addetti - Piano di emergenza per la gestione delle morsicature delle code - Procedure di abbattimento - Procedure di pulizia negli impianti specializzati per lo svezzamento precoce (< 28 giorni)	- Lesioni alla coda - Lesioni alle orecchie - Disordini enterici
5	*Competizione per cibo e spazio*	- Spazio a disposizione - Alimentazione: accesso agli alimenti - Acqua di abbeverata: disponibilità		- Body Condition Score
6	*Alimentazione*		- Gestione degli alimenti e della razione giornaliera	- (Body Condition Score)

Ogni criterio deve essere classificato in una delle tre opzioni di scelta, secondo il livello di rischio seguente:

- "**INSUFFICIENTE**": ossia condizioni che potrebbero impedire a uno o più animali di soddisfare le proprie esigenze biologiche e di godere delle 5 libertà alla base del benessere animale in diretta relazione al rischio della morsicatura della coda;
- **"MIGLIORABILE"**: ossia condizioni che, salvo eccezioni, garantiscono a tutti gli animali presenti di soddisfare le proprie esigenze biologiche in una condizione accettabile che contempli un maggior rispetto delle 5 libertà in un contesto intensivo, in diretta relazione al rischio della morsicatura della coda;
- "**OTTIMALE**": ossia condizioni positive che garantiscono a tutti gli animali di soddisfare le proprie esigenze biologiche in una condizione ottimale che contempli il rispetto delle 5 libertà in un contesto intensivo, in diretta relazione al rischio della morsicatura della coda.

Esempio:

Elemento di verifica **20 (n°19) ABM – Body Condition Score**

Valutazione diretta degli animali. Valutare il numero di animali sottopeso

	TIPOLOGIA
Più del 7% di animali sottopeso	**INSUFFICIENTE**
Tra il 4% e il 7% di animali sottopeso	**MIGLIORABILE**
Meno 4% di animali sottopeso	**OTTIMALE**

LINEE GUIDA - È disponibile un manuale utente che fornisce una guida per la classificazione dei rischi di ciascun criterio. Per ogni criterio la guida affronta il tema in tre sezioni principali:

1. Riferimenti diretti forniti dalla letteratura internazionale uniformemente riconosciuti (es. EFSA journal) e riferimenti legislativi (es. Direttiva 98/58/EC recepito con D.L.vo 146/2001, Direttiva 2008/120/EC recepito con D.L.vo 122/2011)
2. Valutazione del criterio: una domanda specifica con tre possibili risposte
3. Istruzioni dettagliate sulla valutazione dei livelli di rischio di un determinato criterio

VISITA AZIENDALE - Applicazione della valutazione del rischio in campo. La visita aziendale si suddivide in tre fasi:

1. Interviste e verifica documentale: valutazioni sulla gestione dell'azienda
2. Ispezione dell'azienda: valutazioni sulle strutture e attrezzature (misure indirette)
3. Valutazioni sugli animali: ABMs (misure dirette)

IL SISTEMA CLASSYFARM – Le informazioni sulla valutazione del rischio vengono raccolte e analizzate, utilizzando uno strumento di business intelligence, attraverso il sistema ClassyFarm del Ministero della Salute. Questi dati vengono elaborati giornalmente per ottenere valori di rischio generali e specifici. I dati vengono visualizzati utilizzando i cruscotti interattivi e possono essere aggregati a vari livelli geografici (nazione, regione, provincia) o visualizzati per ogni singola azienda agricola. Inoltre, il sistema ClassyFarm fornisce al valutatore un rapporto dettagliato con le valutazioni del livello di rischio dell'azienda agricola a confronto con la media delle altre aziende del sistema. I punti critici sono evidenziati nel report.

CONCLUSIONI – L'obiettivo finale del Piano Nazionale è quello di fermare le pratiche routinarie relative al mozzamento della coda in tutte le aziende. È un obiettivo a lungo termine che richiede un piano di intervento su misura per ogni azienda. I cronoprogrammi degli interventi di miglioramento varieranno a seconda dei livelli di rischio dell'azienda e del costo degli interventi. La pratica del **taglio della coda** allo stato attuale è un'operazione di routine che viene svolta non solo in Italia ma in numerosi altri Paesi europei ad eccezione dei Paesi scandinavi. Tale pratica potrà essere consentita in **deroga** solo quando gli allevamenti dimostreranno, di aver raggiunto livelli **ottimali** su tutti i **punti critici**, ed essere **totalmente conformi** a tutti i requisiti previsti dalla normativa. Tali condizioni di deroga, dovranno essere concordate dai **Servizi veterinari**, e applicate quando ritenute inevitabili.

RIFERIMENTI NORMATIVI:

1. Raccomandazione (UE) 2016/336 della Commissione dell'8 marzo 2016 relativa all'applicazione della direttiva 2008/120/CE del Consiglio che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini in relazione alle misure intese a ridurre la necessità del mozzamento della coda (GU UE L 62/20 del 08-03-2016)
2. Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 122 "Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini" (GU Serie Generale n.178 del 02-08-2011)
3. Decreto Legislativo 26 marzo 2001, n. 146 "Attuazione della direttiva 98/58/CE relativa alla protezione degli animali negli allevamenti" (GU Serie Generale n.95 del 24-04-2001)
4. Nota del Ministero della Salute 0015340-22/06/2018-DGSAF-MDS-P relativa al "Piano di azione nazionale per il miglioramento dell'applicazione del Decreto Legislativo 122/2011 (Direttiva 2008/120/CE) e del Decreto Legislativo 146/2001 (Direttiva 98/58/CE): misure particolari finalizzate alla prevenzione del ricorso al taglio delle code e ad assicurare la disponibilità del materiale di arricchimento ambientale".

ATTI DEL XLV MEETING ANNUALE

Rezzato (BS) - Villa Fenaroli - 21/22 Marzo 2019

MISURE DI PREVENZIONE E CONTROLLO PER MINIMIZZARE IL RISCHIO DI DIFFUSIONE DEL PESTE SUINA AFRICANA NEGLI ALLEVAMENTI SUINICOLI

BELLINI S.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)
Via Bianchi 9, 25124 BRESCIA

Fino alla fine degli anni '90 nei paesi dell'Unione Europea la peste suina africana (PSA) era considerata un pericolo limitato. L'Europa infatti, ad eccezione della Sardegna, era indenne e la PSA era da anni confinata in alcuni paesi del continente africano. Nel 2007 l'infezione è stata segnalata nel Caucaso da dove poi è diffusa incontrollata nei paesi della Federazione Russa e nel 2014 ha raggiunto l'Unione Europea. Da allora, la malattia si è ulteriormente espansa, diffondendo nei suini domestici e nei cinghiali. Attualmente, sono 10 i paesi dell'Unione Europea che sono interessati dalla malattia, l'ultimo, in ordine di tempo è il Belgio dove nel mese di settembre la malattia è stata segnalata nei cinghiali. La situazione epidemiologica è in continua evoluzione e la PSA rappresenta una seria minaccia per l'industria suinicola europea e mondiale. Infatti, ad agosto 2018 la malattia è stata segnalata anche in Cina, che detiene circa il 50% del patrimonio suinicolo mondiale e in pochi mesi sono stati segnalati 112 focolai e sono stati abbattuti quasi un milione di suini. Nei primi mesi del 2019 la PSA è stata riportata anche in Vietnam e Mongolia (2).

La PSA è una malattia endemica per la quale non è disponibile un vaccino efficace e il suo controllo si basa sulla diagnosi precoce seguita dalla rapida applicazione delle misure di eradicazione. Nell'Unione Europea, le disposizioni da applicare in caso di infezione sono principalmente rivolte ai suini domestici e si basano sulla sorveglianza, l'esecuzione dell'indagini epidemiologiche, il rintraccio dei suini e dei prodotti a rischio e l'abbattimento degli animali infetti (3). Tuttavia, al fine di minimizzare il rischio di diffusione della malattia, è necessario che le misure di eradicazione vengano effettuate in combinazione con l'applicazione di misure di prevenzione e di bio-sicurezza nei territori e negli allevamenti indenni. Infatti, considerando la situazione epidemiologica e le possibili ripercussioni economiche conseguenti all'introduzione della PSA, è estremamente importante che i territori indenni siano mantenuti tali prevenendo l'introduzione della malattia. A tal fine, la biosicurezza gioca un ruolo essenziale nella prevenzione della della PSA e, considerato il suo ciclo epidemiologico, misure semplici possono risultare efficaci per mitigare il rischio di trasmissione della malattia (1).

Sta crescendo il numero di segnalazioni di prodotti suini sequestrati ai punti di controllo frontalieri provenienti da paesi infetti e risultati virus positivi per PSA. Questo conferma il ruolo che può essere svolto dell'uomo nella diffusione della malattia, anche a lunga distanza. Infatti, il virus della PSA può rimanere vitale in carne di maiale cruda e nei prodotti di origine suina per diversi mesi. L'importazione illegale o accidentale di prodotti a base di carne suina da paesi infetti, da parte di turisti, operatori, allevatori o cacciatori può rappresenta una seria minaccia per i territori indenni (2). Vale la pena ricordare che sono in atto campagne informative per i veterinari ed il pubblico in generale al fine di dissuadere le persone dal portare prodotti di maiale nei territori indenni, con messaggi mirati a persone chiave come autotrasportatori, cacciatori, allevatori di maiali e veterinari.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Bellini, S., Rutili, D., and Guberti, V. (2016). Preventive measures aimed at minimizing the risk of African swine fever virus spread in pig farming systems. *Acta Vet Scand* 58(1)**,** 82. doi: 10.1186/s13028-016-0264-x.
2. DEFRA (2019). African swine fever in South East Asia. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/781716/uoa-asf-asia-update4.pdf
3. European Commission (2002). "Council Directive 2002/60/EC of 27 June 2002 laying down specific provisions for the control of African swine fever and amending Directive 92/119/EEC as regards Teschen disease and African swine fever". (http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02002L0060-20080903).

CARATTERISTICHE DI RESISTENZA E PERSISTENZA DELLA PESTE SUINA AFRICANA

FELIZIANI F., ISCARO C., PETRINI S., DE MIA G.M.

Centro di referenza nazionale lo studio delle malattie da Pestivirus e da Asfivirus – Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati"

La Peste Suina Africana (PSA) è una malattia virale che rappresenta una minaccia per l'intero settore suinicolo. La malattia, caratterizzata da alta morbilità e mortalità, si manifesta con effetti devastanti sia negli allevamenti domestici che nelle popolazioni selvatiche, ma bisogna ricordare che il rischio di trasmissione dell'infezione, attraverso materiali e prodotti contaminati, causa conseguenze economiche altrettanto rilevanti, che condizionano pesantemente il commercio e il libero scambio a livello internazionale.

Il virus della PSA, infatti, si trasmette efficacemente per contatto diretto tra animale malato e animale sano, ma l'epidemiologia della malattia è fortemente influenzata dalla capacità di sopravvivenza del virus nell'ambiente, nelle carni fresche o congelate, nei prodotti di salumeria e anche nei sottoprodotti della lavorazione. L'Italia è particolarmente interessata alla minaccia rappresentata dalla PSA specialmente considerando l'importanza che, in termini economici, riveste l'industria dei prodotti di salumeria; in questo ambito, il Ministero della Salute ha finanziato alcuni studi con l'obiettivo di approfondire l'influenza della stagionatura sulle caratteristiche di sopravvivenza del virus; ciò ha permesso di acquisire elementi utili a valutare il rischio di trasmissione dell'infezione attraverso questi prodotti.

I servizi veterinari italiani hanno affrontato e prontamente eradicato le incursioni del virus avvenute negli anni '60; diversa è stata invece l'esperienza maturata nella Regione Sardegna dove l'infezione, arrivata nel 1978, ha alternato picchi epidemici a lunghe fasi di endemia e, solo recentemente, si riscontra una positiva evoluzione epidemiologica. L'introduzione di misure straordinarie tese a rimuovere i fattori di persistenza dell'infezione ha infatti avuto l'effetto di ridurre drasticamente l'incidenza di focolai nel domestico e, si spera, potrà avere ulteriori effetti positivi riducendo la pressione virale anche nella popolazione dei suini selvatici.

In attesa che la ricerca riesca a rendere disponibile un vaccino che possa coniugare adeguate *performances* di efficacia e innocuità, la profilassi diretta risulta quindi l'unico strumento utilizzabile per prevenire e contrastare la diffusione dell'infezione; per questo motivo anche in Italia si sta implementando un piano di sorveglianza che possa permettere di svelare prontamente eventuali incursioni dell'infezione e, allo stesso tempo, si stanno verificando i dispositivi, già predisposti, da applicare in caso di emergenza.

L'applicazione di severe misure di restrizione dettate da una specifica valutazione del rischio, rappresenta dunque la base per contrastare l'infezione; su queste basi, l'Unione Europea, ha impostato la cosiddetta "strategia della regionalizzazione" ideata appunto per limitare i danni commerciali negli scambi tra i paesi membri e per impostare le opportune relazioni con i paesi terzi.

LA PESTE SUINA NEL CINGHIALE IN EUROPA

GUBERTI V.

ISPRA, Ozzano E. (BO)

Il virus della Peste suina africana è stato introdotto in Georgia nel 2007 per poi diffondersi in buona parte dell'Eurasia (dal Belgio alla Cina seppur con discontinuità di areale). Inizialmente il virus si è avvantaggiato dell'assenza di qualsiasi misura di biosicurezza nell'allevamento del suino nell'area Caucasica. Le prime osservazioni di una partecipazione del cinghiale nell'epidemia di PSA avvengono a fine 2008 inizio 2009 quando il virus è segnalato nelle Repubbliche Autonome della Federazione Russa (Gogin et al., 2013) a prevalente religione mussulmana (includendo anche le incursioni dall'Armenia in Iran). La peste, raggiunte le pianure cerealicole del sud della Russia, si endemizza nel maiale con occasionali casi nel cinghiale (Oganesyan et al., 2013). A sud ovest di Mosca si crea un'ulteriore area endemica in cui il cinghiale è maggiormente coinvolto (ad esempio Smolensk Oblast). Il cinghiale assume il ruolo di unico serbatoio epidemiologico quando il virus è introdotto UE nel 2014 (Chenais et al., 2019). Di fatto la gestione venatoria, creando popolazioni di cinghiale over-abbondanti, sostanzialmente artificiali, a distribuzione pressoché continua tra i Paesi Baltici, Russia, Polonia e Bielorussia ha facilitato la persistenza di un virus africano in Nord Europa. Attualmente sono sotto restrizione circa 350.000 kmq di foreste, abitate da una popolazione di 500-600.000 cinghiali.

La diffusione del virus avviene secondo 2 modalità ben distinte (EFSA, 2018):

a) Tramite una naturale onda epidemica – rabbia simile –la cui direzione e velocità sono determinate dalla continuità di areale e dalla densità locale del cinghiale; l'onda ha una velocità di 1-3 km/mese e si lascia – invariabilmente - alle spalle una endemia a bassa prevalenza (1-2%) che persiste da 5 anni nonostante la bassissima densità del cinghiale. Il ciclo endemico è favorito dalla letalità del virus (circa 90%) e dalla sua resistenza; il virus produce numerose carcasse che attraverso molteplici meccanismi possono infettare animali recettivi.
b) Introduzioni determinate dall'uomo che trasporta inavvertitamente il virus a breve-medio e lungo raggio. Il virus introdotto nella nuova area inizia il caratteristico ciclo: progressiva onda epidemica e successiva endemizzazione dietro il fronte epidemico.

Per l'Italia il rischio d'introduzione del virus attraverso la naturale diffusione geografica nelle popolazioni di cinghiale è prevedibile, relativamente lontana a venire e condizionata dall'evoluzione epidemiologica nei Balcani e in Belgio. Al contrario l'introduzione tramite l'uomo è un rischio costante difficilmente prevedibile e quantificabile.

Considerando che la probabilità di eradicazione del virus nelle popolazioni di cinghiale è inversamente proporzionale all'estensione della zona infetta, risulta necessario trovare il virus immediatamente alla sua introduzione e di conseguenza tentarne l'eradicazione in una zona infetta di ridotte dimensioni (Guberti et al., 2018). Una ritardata scoperta del virus implicherebbe un'ampia zona infetta cui corrispondono enormi difficoltà di gestione sia tecniche sia logistiche (n. di carcasse da trovare e distruggere, ampie zone interdette alla caccia, conflittualità col mondo venatorio e agricolo, maggior numero di maiali sottoposti a restrizione ecc.). Di conseguenza si ritiene di primaria importanza costruire un'appropriata strategia di EARLY DETECTION del virus, basata sulla sorveglianza passiva (test su campioni ottenuti da cinghiali morti) da realizzarsi considerando efficienza, fattibilità e sostenibilità nel breve, medio e lungo periodo e che coinvolga larga parte del territorio nazionale.

BIBLIOGRAFIA

1. Chenais, E., Depner, K., Guberti, V., Dietze, K., Viltrop, A., & Ståhl, K. (2019). Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014–2018. *Porcine health management*, *5*(1), 6.
2. EFSA (European Food Safety Authority), Boklund A, Cay B, Depner K, Földi Z, Guberti V, Masiulis M, Miteva A, More S, Olsevskis E, Šatrán P, Spiridon M, Stahl K, Thulke H-H, Viltrop A, Wozniakowski G, Broglia A, Cortinas Abrahantes J, Dhollander S, Gogin A, Verdonck F, Amato L, Papanikolaou A and Gortázar C, 2018. Scientific report on the epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2017 until November 2018). *EFSA Journal* 2018;16(11):5494, 106 pp. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5494
3. Gogin, A., Gerasimov, V., Malogolovkin, A., & Kolbasov, D. (2013). African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012. *Virus research*, *173*(1), 198-203.
4. Guberti V., Khomenko S., Masiulis M., Kerba S., (2018) Handbook on African Swine Fever in wild boar and biosecurity during hunting. OIE/FA/EC Standing Group of Experts on African swine fever in Europe under the GF-TADs umbrella; OIE; 101 pp. http://web.oie.int/RR-Europe/eng/eng/Regprog/docs/docs/GF-ADs%20Handbook_ASF_WILDBOAR%20version%202018-12-19.pdf
5. Oganesyan, A. S., Petrova, O. N., Korennoy, F. I., Bardina, N. S., Gogin, A. E., & Dudnikov, S. A. (2013). African swine fever in the Russian Federation: spatio-temporal analysis and epidemiological overview. *Virus research*, *173*(1), 204-211.

CONTROLLO DI *SALMONELLA* NEGLI ALLEVAMENTI SUINI NELL'ERA POST-ANTIBIOTICO

FOSTER N.

The School of Veterinary Science and Medicine, University of Nottingham, UK.

Nell'Unione europea, vengono riportati circa 100 000 casi di salmonellosi umana all'anno, con un costo annuale di 3 miliardi di euro. I suini rimangono un'importante fonte di infezione zoonosica e, in molti paesi dell'UE, la prevalenza di *Salmonella* nei suini rimane elevata. Tuttavia, l'infezione da *Salmonella* nei suini ha anche un impatto economico, dovuto alla riduzione del peso alla macellazione e alla predisposizione dei suini all'infezione da altri agenti patogeni. Le preoccupazioni relative alla resistenza antimicrobica (AMR) hanno portato ad una riduzione dell'uso profilattico e metafilattico degli antibiotici negli allevamenti, e di conseguenza ad una sempre maggiore necessità di trovare misure che possano ridurre la prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti senza intervento antibiotico. Sebbene siano state adottate misure di controllo per ridurre la diffusione della *Salmonella* durante il periodo di ingrasso e alla macellazione, un approccio più razionale sarebbe quello di ridurre la *Salmonella* durante il ciclo produttivo, iniziando da scrofe e suinetti.

La lecture discuterà quattro interventi che possono essere utilizzati come programma di controllo integrato per ridurre la prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti di suini. In particolare:

(1) Miglioramento della biosicurezza esterna; dati recenti di studi di analisi del rischio su allevamenti da riproduzione e a ciclo chiuso e interventi adeguati a ridurre *Salmonella*.

(2) Miglioramento della biosicurezza interna; studi e interventi di analisi del rischio che riducono la *Salmonella* negli allevamenti di suini, inclusi programmi di pulizia e disinfezione comprovati per le unità di parto e i metodi per ridurre *Salmonella* nel cibo e nell'acqua.

(3) vaccinazione; utilizzando i vaccini per *Salmonella* disponibili in commercio e vaccini sperimentali, che potrebbero avere un potenziale nei futuri programmi di controllo della *Salmonella* e come nuovi dati sul microbiota possano essere utilizzati per controllare la *Salmonella* nei suini.

(4) Ridurre lo stress; uso della musica classica e del contatto umano per ridurre i livelli di cortisolo nel sangue nelle scrofe partorienti, in correlazione con la riacutizzazione di *Salmonella*.

CONTROLLO DELLA *SALMONELLA* FROM FARM TO FORK: IL PUNTO DELLA SITUAZIONE

MARTELLI F.

Animal and Plant Agency, UK

Nei Paesi della Comunità Europea, l'infezione da *Salmonella* nei suini rappresenta un problema di non facile soluzione. L'ultima attività di sorveglianza sistematica, su base campionaria, per valutare la prevalenza di *Salmonella* negli allevamenti suinicoli europei risale al 2008, quando, complessivamente, il 28,7% degli allevamenti con riproduttori risultò positivo per *Salmonella.* Per Italia e Regno Unito, la prevalenza risultò molto simile (51,2% e 52,2%, rispettivamente). Nel Regno Unito, uno studio di prevalenza condotto al macello nel 2013 ha riportato una prevalenza del 30,5% in campioni cecali.
Studi condotti per valutare le fonti di salmonellosi umana derivanti dal consumo di diversi tipi di alimenti hanno riportato che la carne suina o prodotti derivati sono la seconda causa di salmonellosi umana nella Comunità Europea (31,1% dei casi). Sono comunque presenti delle significative variazioni tra i diversi Paesi europei: nel Sud Europa il contributo della carne suina e derivati è superiore rispetto al Nord Europa (43,6% dei casi) (De Knegt et al 2015).
A livello Europeo, al momento, non ci sono piani di controllo dell'infezione da *Salmonella* negli allevamenti suinicoli. I piani di controllo sono focalizzati a livello di macello, tramite l'applicazione del regolamento europeo EC 2073/2005 (con le modifiche apportate nel 2014) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. In particolare, per soddisfare i criteri di igiene del processo, i macelli devono adottare un piano di campionamento per le carcasse suine. Se il limite di prevalenza viene superato, il macello è obbligato a migliorarei le misure igieniche dei processi e a contattare l'allevamento di origine delle carcasse positive e controllare il loro piano di biosicurezza. In Italia, nel 2017, il 3,92% (intervallo di confidenza al 95%: 3,44 - 4,45) delle carcasse campionate dall'Autorità competente sono risultate positive per *Salmonella* (EFSA 2018).
Partendo dal presupposto che è necessario ridurre il rischio di trasmissione all'uomo dell'infezione da *Salmonella* causata dal consumo di carne o prodotti di origine suina, due sono gli ambiti principali di intervento: a) la necessità di ridurre la prevalenza dell'infezione nei suini e, b) il miglioramento delle pratiche igieniche al macello.

Controllo della *Salmonella* in allevamento

L'eradicazione di *Salmonella* dagli allevamenti infetti è molto difficile ma è possibile implementare misure efficaci di riduzione della prevalenza.
Il primo passo necessario è il controllo dei riproduttori. Allevamenti completamente chiusi non sono molto frequenti e l'acquisto di nuovi animali (soprattutto scrofette) rappresenta il principale fattore di rischio per l'introduzione di *Salmonella* in allevamento. Il controllo degli animali di nuova introduzione e la quarantena sono misure necessarie per evitare l'introduzione di nuovi ceppi di *Salmonella* in precedenza non presenti in allevamento e che tenderebbero a diffondersi rapidamente.
In presenza di gruppi di animali infetti, occorre evitare di rimescolare gruppi diversi; l'attuazione di pratiche di tutto pieno / tutto vuoto a partire dallo svezzamento e fino a fine ciclo è una misura sanitaria molto importante. Il corretto management del flusso dei suini, associato a efficaci protocolli di disinfezione e di controllo dei roditori hanno dimostrato, in situazioni controllate, di poter ridurre di un terzo la prevalenza in allevamento.
L'utilizzo di vaccini contro *Salmonella* Typhimurium è un altro sistema efficace per la

riduzione della prevalenza di *Salmonella* in allevamento. Come per altre malattie del suino, la vaccinazione da sola non è in grado di eliminare il problema ma, se usata in associazione ad altre misure sanitarie, può contribuire in misura considerevole alla riduzione della prevalenza (Andres and Davies 2015).
Un'altra pratica che consente di migliorare il controllo dell'infezione è rappresentata dall'uso di formulazioni mangimistiche che, garantendo una elevata acidità gastrointestinale, creano condizioni sfavorevoli alla crescita di *Salmonella*. L'alimentazione in broda (con un pH di 4,5 o inferiore) o l'impiego di mangimi ad elevata granularità sono da preferire rispetto ai mangimi pellettati. Inoltre, mangimi con un basso contenuto di farine di grano e almeno il 25% di contenuto d'orzo favoriscono lo sviluppo di una flora gastrointestinale che sfavorisce la replicazione della *Salmonella* (perché, ad esempio, più ricca di lattobacilli).
Diversi studi hanno valutato l'efficacia di acidi organici aggiunti ai mangimi o al sistema idrico in allevamento. I risultati di questo tipo di intervento sono altamente variabili e dipendono dal tipo di acidi organici utilizzati, dalla durata del trattamento e della classe di età trattata. Questo tipo di trattamento è, ancora una volta, utile alla riduzione della prevalenza di infezione, ma non è risolutivo per l'eliminazione della *Salmonella* (Wales et al 2010).

Controllo della *Salmonella* al macello

Il trasporto dall'allevamento al macello e la permanenza nelle stalle di sosta rappresentano momento critici per la riattivazione dell'escrezione fecale in soggetti con infezione silente e per l'infezione con nuovi ceppi di *Salmonella* attraverso il contatto con animali di provenienza diversa o la contaminazione fecale residua nell'ambiente. Nelle fasi di pre-macellazione occorre considerare che *Salmonella* si distribuisce molto velocemente dall'intestino ai linfonodi attraverso il sistema linfatico e che gli elevati livelli di escrezione causano un aumento del rischio di cross-contaminazione durante le fasi di macellazione (Wilhelm et al 2017).
Durante il processo di depilazione, è importante che le carcasse vengano abbondantemente irrigate. E' stato dimostrato che *Salmonella* può permanere e moltiplicarsi nei residui di depilazione; per questo motivo è quindi molto importante che le carcasse siano prive di residui alla fine di questa fase.
I processi di scottatura e bruciatura sono cruciali per una riduzione della contaminazione della carcassa nelle prime fasi della macellazione e numerosi studi hanno dimostrato l'efficacia di questi processi. È tuttavia importante garantire alcuni requisiti quali come la temperatura della vasca di scottatura e la direzione della fiamma della bruciatura, che deve raggiungere tutta la carcassa (Young et al 2016).
Anche le fasi di eviscerazione sono critiche e, in particolare, la pulizia degli strumenti e dei macchinari è fondamentale a questo livello.
Il raffreddamento rapido è l'ultimo passaggio per l'abbattimento dei livelli di contaminazione o l'eliminazione della *Salmonella* dalle carcasse. Se eseguito in maniera ottimale, può esitare nella riduzione dei livelli di *Salmonella* di 0,8 log (Chang et al 2003).
L'infezione da *Salmonella* è un problema multifattoriale, ed è generalmente riconosciuto che le misure applicate al macello sono quelle più economiche e più efficaci nel determinare una riduzione del rischio di infezione per via alimentare nel consumatore. Diminuire la prevalenza di animali infetti che raggiungono il macello è però essenziale per ridurre la contaminazione negli stabilimenti di macellazione e aumentare l'efficacia delle misure qui applicate. La biosicurezza in allevamento è quindi essenziale in termini di sanità pubblica (Bollaerts et al 2010, Berriman et al 2013). Anche se costoso, il controllo dell'infezione da *Salmonella* in allevamento attraverso un miglioramento della biosicurezza e l'implementazione di specifiche misure di controllo, consente anche di migliorare le performances dei suini, con conseguente beneficio economico per gli allevatori.

BIBLIOGRAFIA

1. Andres VM, Davies RH. Biosecurity measures to control *Salmonella* and other infectious agents in pig farms: a review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2015. doi: 10.111/1541-4337,12137.
2. Bollaerts K, Messens W, Aerts M, Dewulf J, Maes D, Grijspeerdt K, et al. Evaluation of scenarios for reducing human salmonellosis through household consumption of fresh minced pork meat. Risk analysis : an official publication of the Society for Risk Analysis. 2010;30(5):853-65. doi: 10.1111/j.1539-6924.2010.01368.x. PubMed PMID: 20199654.
3. Berriman AD, Clancy D, Clough HE, Armstrong D, Christley RM. Effectiveness of simulated interventions in reducing the estimated prevalence of *Salmonella* in UK pig herds. PloS one. 2013;8(6):e66054. doi: 10.1371/journal.pone.0066054. PubMed PMID: 23840399; PubMed Central PMCID: PMC3695987.
4. Chang VP, Mills EW, Cutter CN. Reduction of bacteria on pork carcasses associated with chilling method. J Food Prot. 2003 Jun;66(6):1019-24.
5. De Knegt LV, Pires SM, Hald T. Attributing foodborne salmonellosis in humans to animal reservoirs in the European Union using a multi-country stochastic model. Epidemiology and Infection 2015; 143: 1175– 1186. doi: 10.1017/S0950268814001903.
6. EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2017. EFSA Journal 2018;16(12):5500.
7. Wales AD, Allen VM, Davies RH. 2010. Chemical treatment of animal feed and water for the control of *Salmonella*. Foodborne Pathog Dis 7:3–15.
8. Wilhelm BJ, Young I, Cahill S, Desmarchelier P, Nakagawa R, Rajić A. Interventions to reduce non-typhoidal *Salmonella* in pigs during transport to slaughter and lairage: Systematic review, meta-analysis, and research synthesis based infection models in support of assessment of effectiveness. Prev Vet Med. 2017;145:133-144. doi: 10.1016/j.prevetmed.2017.07.001.
9. Young I, Wilhelm BJ, Cahill S, Nakagawa R, Desmarchelier P, Rajić A. A Rapid Systematic Review and Meta-Analysis of the Efficacy of Slaughter and Processing Interventions to Control Non-Typhoidal *Salmonella* in Beef and Pork. J Food Prot. 2016; 79(12):2196-2210. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-16-203.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

RELAZIONI TRA QUALITÀ DEI MATERIALI DI ARRICCHIMENTO E ANIMAL BASED MEASURES NEI SUINI IN ACCRESCIMENTO

RELATIONSHIPS BETWEEN QUALITY OF ENRICHMENT MATERIALS AND ANIMAL BASED MEASURES IN GROWING PIGS

MAISANO A.M.[1], SANTUCCI G.[1], SCALI F.[1], GIUDICI F.[1], AMICABILE A.[1], GIACOMINI E.[1], LAZZARO M.[1], TONNI M.[1], VEZZOLI F.[2], CASTELLUCCIO D.[3], SANTUCCI V.U.[3], BERTOCCHI L.[4], 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]Ministero della Salute - [4]Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale

Parole Chiave: lesioni da morsicatura alla coda, materiali di arricchimento, benessere animale
Key Words: tail biting lesions, enrichment materials, animal welfare

RIASSUNTO: L'uso dei materiali d'arricchimento è un punto chiave per la prevenzione delle lesioni d'aggressione quali la morsicatura della coda. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di indagare le relazioni tra la qualità dei materiali d'arricchimento e le misure dirette sugli animali. Nel 2017 sono stati visionati 78 allevamenti e 13.791 suini divisi per categorie d'età (6-35Kg, 36-70Kg e >70Kg). I suini sono stati divisi in gruppi in base al materiale d'arricchimento, Insufficiente (non valutabile, marginale, sub-ottimale) e Ottimale (ottimale). La prevalenza di lesioni al corpo lievi è risultata significativamente più alta ($p \leq 0{,}001$) nel gruppo Insufficiente rispetto all'Ottimale, per le categorie 6-35Kg e >70Kg, rispettivamente, Odds ratio (OR) 5,8 e 5,3. Il comportamento esplorativo del materiale d'arricchimento ha evidenziato delle differenze ($p<0{,}001$) nelle prevalenze con un maggior utilizzo nel gruppo Ottimale rispetto all'Insufficiente per le categorie di peso 6-35Kg e >70Kg (OR, rispettivamente, 4,6 e 2,2). Non sono state riscontrate differenze per le lesioni alle code (prevalenza globale 0,12%), tuttavia l'intero campione era caudectomizzato. I risultati hanno evidenziato come l'impiego di un solo materiale di categoria marginale o sub-ottimale risulta meno efficace dell'impiego di materiali di categoria ottimale. La scelta della qualità del materiale d'arricchimento e del relativo utilizzo è fondamentale per un corretto approccio alla prevenzione delle lesioni da aggressione.

ABSTRACT: Proper enrichment materials represent a key point to prevent aggression injuries such as tail biting lesions. Nevertheless, evaluating the effects of those materials may be difficult. The aim of this study was to investigate relationships between quality of enrichment materials and animal based measures. During 2017, 13,791 pigs in 78 farms (mean 177±45) were inspected considering their weight categories (6-35kg, 36-70kg and >70Kg). Pigs were divided in two groups based on the enrichment materials: *Insufficient* (non-evaluable, marginal, sub-optimal materials) and *Optimal* (optimal materials). Prevalence of *wounds on the body (mild)* was significantly higher ($p \leq 0.001$) in the *Insufficient* group for the categories 6-35 Kg (OR 5.8; 95% CI 2.9-12.2) and >70 kg (OR 5.3; 95% CI 2.0-13.7). *Explorative behaviour* of the enrichment material was significantly higher ($p \leq 0.001$) in the *Optimal* group regarding the categories 6-35 Kg (OR 4.6; 95% CI 3.5-6.1) and >70 kg (OR

2.2; 95% CI 1.6-3.0). No differences in prevalences of tail biting lesions were found but all pigs were tail-docked and those lesions were rare (overall prevalence 0.12%). The results of this study confirm that using only one material of marginal or sub-optimal quality is less effective than using enrichment materials of optimal quality. Selecting enrichments materials of appropriate quality is pivotal for pig welfare, particularly, for the prevention of aggression injuries.

INTRODUZIONE

I materiali d'arricchimento per i suini sono un requisito essenziale sancito dal D.L.vo 122/2011 per il benessere dei suini, tuttavia sono state fornite poche indicazioni sulle tipologie da impiegare, in particolare per gli allevamenti con pavimentazioni completamente fessurate.

La Raccomandazione della Commissione Europea 336/2016, che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini in relazione alle misure intese a ridurre la necessità del mozzamento della coda, ha trattato con maggior dettaglio la qualità dei materiali d'arricchimento che devono essere impiegati. Questi risultano come uno dei sei punti chiave relativi alla valutazione del rischio, che ogni allevamento deve approntare con il fine di verificare le condizioni del proprio allevamento. La valutazione del rischio è fondamentale per far emergere eventuali punti critici ai fini di allevare suini a coda integra.

I materiali di arricchimento dovrebbero permettere ai suini di soddisfare i loro bisogni fondamentali senza comprometterne la salute. A tal fine i materiali di arricchimento dovrebbero essere sicuri e presentare le seguenti caratteristiche: commestibilità (in modo che i suini possano mangiarli e annusarli, preferibilmente con benefici nutrizionali); masticabilità (in modo che i suini possano morderli); esplorabilità (in modo che i suini possano esplorarli con il grugno); essere manipolabili (in modo che i suini possano modificarne la posizione, l'aspetto o la struttura). Inoltre, i materiali di arricchimento dovrebbero essere forniti in modo tale da essere: di interesse sostenibile (dovrebbero cioè incoraggiare il comportamento esplorativo dei suini ed essere regolarmente sostituiti e aggiunti); accessibili per la manipolazione orale; forniti in quantità sufficiente; puliti e igienici. Tutti i requisiti sopradescritti devono essere posseduti dai materiali d'arricchimento utilizzati (Raccomandazione UE 2016/336; SWD 49, 2016). I materiali d'arricchimento sono classificati come segue: materiali ottimali (materiali che presentano tutte le caratteristiche elencate precedentemente e che quindi possono essere utilizzati da soli); materiali subottimali (materiali che presentano la maggior parte delle caratteristiche elencate precedentemente e che quindi dovrebbero essere utilizzati in combinazione con altri materiali); materiali di interesse marginale (materiali che costituiscono una distrazione per i suini ma che non dovrebbero essere considerati tali da soddisfare i loro bisogni fondamentali, e quindi dovrebbero essere forniti anche materiali ottimali o subottimali) (Raccomandazione UE 2016/336).

Inoltre, la Commissione Europea ha redatto uno Staff Working Document (SWD 49, 2016) al fine di definire con precisione l'impiego di questi materiali di arricchimento, stabilendo per ogni materiale subottimale la complementarietà come da Tab. 1.

Tab. 1 – Categorizzazione dei materiali di arricchimento e complementarietà d'utilizzo (SWD 49, 2016).

Tab. 1 – Categorization of enrichment materials and their complementarity of use (SWD 49, 2016).

Materiali	Forniti come	Grado di interesse come materiali di arricchimento	Con l'eventuale aggiunta di…
Paglia, Fieno, insilato, miscanto, radici	Lettiera	Materiali ottimali	**Possono essere usati da soli**
Terra	Lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili e masticabili
Trucioli di piallatura	Lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili e masticabili
Segatura	Lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili e masticabili
Compost di funghi, torba	Lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili
Sabbia e sassolini	Lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili e masticabili
Carta in strisce	Parziale lettiera	Materiali subottimali	Materiali commestibili
Dispenser di pellet	Dispenser	Materiali subottimali	In base alla quantità di pellet forniti
Paglia, fieno o insilato	Mangiatoia a rastrelliera o dispenser	Materiali subottimali	Materiali esplorabili e manipolabili
Legno morbido non trattato, cartone, corda naturale, sacca di iuta	Oggetti	Materiali subottimali	Materiali commestibili ed esplorabili
Cilindri di paglia compressa	Oggetti	Materiali subottimali	Materiali esplorabili e manipolabili
Mattoncini di segatura (sospesi o fissati)	Oggetti	Materiali subottimali	Materiali commestibili, esplorabili e manipolabili
Catene, gomma, tubi in plastica morbida, plastica dura, legno duro, palle, sale da leccare	Oggetti	Marginale	**Da integrare con materiali ottimali o subottimali**

Le ABMs ovvero le misure dirette sugli animali, sono degli indicatori che definiscono il grado di adattamento o meno dell'animale all'ambiente in cui vive (WQ, 2009; EFSA, 2012). Alcune di queste sono configurate come lesioni direttamente influenzate dal comportamento dei suini come ad esempio i comportamenti stereotipici o aggressivi come ad esempio la morsicatura della coda di altri suini. Alcune di queste sono state validate da numerosi lavori scientifici facenti capo al protocollo di valutazione proposto dal gruppo di lavoro del Welfare Quality (2009). L'EFSA, nei suoi pareri scientifici ha proposto di rilevare poche ABMs per singola categoria di suino, al fine di ridurre gli sforzi e uniformare ulteriormente il metro

di giudizio (EFSA, 2012). Per la categoria dei suini in accrescimento le ABMs consigliate sono: segni di malattia, lesioni cutanee, lesioni alle code e alle orecchie, comportamento esplorativo, il gruppo di misure relative alla termoregolazione (EFSA, 2012).
Le ABMs maggiormente rilevate in questi anni in letteratura sono concentrate al rilievo di lesioni da morsicatura alla coda (Scollo et al. 2016) e alle orecchie (Bottacini et al. 2018); inoltre, molti lavori suggeriscono la fattibilità di svolgere questi rilievi al macello (Maisano et al. 2015, Van Staaveren et al. 2017).
Questo lavoro è stato svolto nell'ambito di un progetto di ricerca "BioFaBenMa" e finanziato dal Ministero della Salute su allevamenti che hanno richiesto, tramite medici veterinari incaricati dall'allevatore o dalle filiere, un supporto per la valutazione del benessere animale.
L'obiettivo di questo studio è stato quello di analizzare in fase preliminare la presenza o meno di relazioni tra la qualità dei materiali di arricchimento e la presenza di osservazioni ABMs nei suini in accrescimento.

MATERIALI E METODI

Campione
Lo studio è stato svolto su 78 allevamenti, situati in Centro – Nord Italia su un totale di 13.791 suini allevati in 608 baste. Nel 2017 sono stati svolti i sopralluoghi, su richiesta degli allevamenti, per la raccolta delle informazioni sul benessere animale. In tutti gli allevamenti erano presenti suini a sola coda mozzata.

Animal Based Measures
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 le ABMs più rilevanti, secondo quanto indicato in letteratura. Per ciascuna azienda sono stati esaminati un minimo di 150 soggetti in almeno 10 box scelti casualmente ed in modo rappresentativo della realtà dell'allevamento. Sono stati valutati distintamente i suini per tre fasce di peso: 6-35Kg, 36-70 Kg e >70Kg.
Le osservazioni selezionate per questo studio sono: le lesioni da morsicatura della coda, le lesioni da aggressione al corpo lievi e gravi e il numero di suini che mostrano il comportamento di esplorazione del materiale di arricchimento (WQ 2009).

Materiali d'arricchimento e gruppi
I materiali di arricchimento sono stati classificati in 4 categorie: marginali, subottimali, ottimali e non valutabili (Raccomandazione UE 336/2016, SWD 49, 2016).

Analisi statistica
Al fine di analizzare le differenze i suini sono stati suddivisi in gruppi a seconda della categoria del materiale di arricchimento: Marginale, Sub-ottimale, Ottimale e Non valutabile. Le informazioni riguardanti la qualità del materiale di arricchimento e le ABMs sono state inserite e processate attraverso il sistema di monitoraggio integrato ClassyFarm (Ex BioFaBenMa). Le differenze tra i gruppi (Marginale, Sub-ottimale, Ottimale e Non valutabile) per le varie classi di peso (6-35Kg, 36-70 Kg e >70Kg) sono state indagate secondo il Test del chi-quadrato. Le differenze sono state approfondite tramite il Test esatto di Fischer tra i gruppi Insufficiente (insieme dei gruppi Non Valutabile, Marginale e Sub-ottimale) e Ottimale per le ABMs lesioni al corpo lievi e gravi e per le lesioni da morsicatura della coda. Mentre per il comportamento di esplorazione del materiale d'arricchimento dal gruppo Insufficiente è

stato escluso il sottogruppo Non Valutabile in quanto fonte di bias. Tutte le analisi statistiche sono state svolte utilizzando il GraphPad Prism 6.05 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

RISULTATI
I risultati relativi alla prevalenza delle osservazioni ABMs nei gruppi di suini per le varie classi di peso sono presentati in Tab. 2.
I risultati delle analisi hanno evidenziato delle differenze statisticamente significative tra i gruppi nella categoria 6-35Kg per le lesioni al corpo lievi (p<0,0001) e per il comportamento esplorativo manipolabili (p<0,0001). I medesimi risultati sono emersi anche per la categoria >70Kg (lesioni al corpo lievi, p<0,0001; comportamento esplorativo manipolabili, p<0,0001).
Le altre ABMs (lesioni al corpo gravi e lesioni da morsicatura alla coda) non hanno presentato differenze significative tra i gruppi in nessuna delle categorie di peso oggetto di studio. Per la categoria 36-70 Kg non sono emerse differenze statisticamente significative per nessuna delle ABMs rilevate.
L'analisi tramite il Test esatto di Fischer tra i gruppi Ottimale e Insufficiente, ha evidenziato delle differenze statisticamente significative nella categoria 6-35 Kg per le lesioni al corpo lievi (p<0,0001), con una probabilità maggiore (Odds ratio 5,8; IC95% 2,9 - 12,2) che siano presenti nel gruppo Insufficiente. Sempre nella medesima categoria è risultata una differenza significativa tra i gruppi Ottimale e Insufficiente nel comportamento esplorativo per i manipolabili (p<0,0001), con una probabilità maggiore (Odds ratio 4,6; IC95% 3,5 - 6,1) che venga usato il materiale manipolabile nel gruppo Ottimale. I medesimi risultati sono emersi anche per la categoria >70Kg (lesioni al corpo lievi, p=0,0001 con una probabilità maggiore, Odds ratio 5,3 IC95% 2,0 - 13,7, che siano presenti nel gruppo Insufficiente; comportamento esplorativo per i manipolabili, p<0,0001 con una probabilità maggiore, Odds ratio 2,2 IC95% 1,6 - 3,0, che venga usato il materiale di arricchimento nel gruppo Ottimale). Le altre ABMs (lesioni al corpo gravi e lesioni da morsicatura alla coda) non hanno presentato differenze significative tra i gruppi Ottimale e Insufficiente in nessuna delle categorie di peso oggetto di studio. Per la categoria 36-70 Kg non sono emerse differenze statisticamente significative per nessuna delle ABMs rilevate.

DISCUSSIONE

Qualità dei materiali d'arricchimento
La nota (0015340-22/06/2018-DGSAF-MDS-P) del Ministero della Salute ha recentemente trasmesso le specifiche indicazioni del Piano Nazionale corredate dalle Linee guida per la prevenzione del taglio della coda nell'allevamento suino dallo svezzamento all'ingrasso a cura del Ministero, dell'IZSLER e del CReNBA (Linee guida, 2018). Per quanto riguarda il materiale di arricchimento le linee guida hanno stabilito tre livelli di rischio sia per la qualità che per la quantità e il relativo grado di utilizzo.
Il livello migliorabile (livello intermedio) per la valutazione della qualità del materiale d'arricchimento, viene stabilito da una commistione di materiali complementari al fine di garantire per tutti i criteri (commestibili, masticabili, esplorabili e manipolabili) un livello accettabile. Questa condizione non è stata ritrovata in nessun allevamento, tuttavia data la presenza del Piano Nazionale sulla prevenzione della morsicatura della coda, si suppone che nel prossimo futuro sarà probabilmente possibile analizzare anche questo gruppo. Il gruppo Insufficiente è paragonabile alla definizione del medesimo livello di rischio presente nelle linee guida, così come anche per il gruppo Ottimale con l'omonimo livello di rischio. La presenza di materiali di categoria marginale o sub-ottimale utilizzati da soli non soddisfa tutti e i criteri che

dovrebbero possedere i materiali di arricchimento, come definito dalla Raccomandazione della Commissione Europea 336/2016 e dal documento di lavoro (SWD 49, 2016).
Il limite di questo studio è stato rappresentato dall'estrema variabilità che si ritrova nei materiali di arricchimento, il raggruppamento secondo la codifica presentata (SWD 49, 2016) ha permesso in parte di porre rimedio alla problematica permettendo la formazione dei gruppi analizzabili statisticamente sulla base delle evidenze scientifiche uniformemente riconosciute. Tuttavia, si sottolinea e concorda, che anche se alcuni materiali di categoria sub-ottimale (es. paglia in rastrelliera) siano effettivamente migliori di altri (es. tronchetto di legno morbido), non risulta sufficiente l'utilizzo di un solo materiale di arricchimento di questa categoria (SWD 49, 2016). Tenendo in considerazione che l'interesse verso i materiali di arricchimento cala con il crescere dell'età (Scollo et al., 2016), la possibilità di un ricambio periodico con tipologie diverse di materiali è una delle pratiche manageriali basilari per la prevenzione delle lesioni da aggressione (Linee guida, 2018).

ABMs

Le prevalenze medie delle lesioni osservate riportano valori in linea rispetto a recenti lavori, per le lesioni da morsicatura della coda il dato medio complessivo risulta sovrapponibile a recenti studi, sia in svezzamento (0,2% Vs 0,09%) che nell'ingrasso (0,1% Vs 0,26%) (Scollo et al. 2016). Mentre, per le lesioni al corpo lievi e gravi risulta difficile la comparazione con altri lavori, poiché vengono utilizzate metodiche differenti, e ci si augura si arrivi ad uno standard uniformemente condiviso (Kongsted and Sørensen, 2017).
Le lesioni al corpo lievi e il comportamento esplorativo sui manipolabili sono le ABMs che hanno mostrato delle differenze statisticamente significative tra i gruppi. In particolare, è stato evidenziato che i gruppi con soli materiali d'arricchimento di categoria marginale o sub-ottimale mostrano una prevalenza di lesioni maggiori rispetto ai gruppi allevati con soli materiali ottimali per tutte le categorie di peso esaminate. I gruppi di animali del gruppo Non valutabile nelle categorie 36-70 Kg e >70Kg hanno evidenziato delle prevalenze di lesioni paragonabili ai suini che avevano a disposizione il materiale manipolabile di sola categoria marginale o sub-ottimale. Nella categoria 6-35 Kg il gruppo Non valutabile ha riportato una prevalenza media di lesioni, inferiore ai suini dei gruppi Marginale e Sub-ottimale, tuttavia questo risultato è solo indicativo poiché le differenze nell'età e nel peso di quando è stata effettivamente eseguita la valutazione può aver influenzato il risultato (es. maggior parte delle rilevazioni eseguite sui suini di 6 Kg).
Il comportamento esplorativo a livello di materiali di arricchimento, nelle categorie 6-35 Kg e >70 Kg, ha evidenziato un utilizzo superiore per quanto riguarda i gruppi Ottimali, e un graduale minor utilizzo legato al crescere dell'età e del peso (Scollo et al., 2016). Per la categoria 36-70 Kg non sono emerse differenze statisticamente significative dovute probabilmente alla scarsa numerosità del gruppo Ottimale. In conclusione, le evidenze date dalle prevalenze delle ABMs relative all'aggressività (lesioni al corpo lievi) e al comportamento relativo all'esplorazione del materiale d'arricchimento, mostrano come effettivamente solo i gruppi con materiale d'arricchimento di categoria ottimale presentino una prevalenza di lesioni significativamente inferiore e un comportamento esplorativo superiore agli altri gruppi.

CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo lavoro evidenziano come il materiale manipolabile di categoria ottimale riduce significativamente le lesioni del corpo sui suini in accrescimento per tutte le categorie di peso prese in esame.
L'impiego di una commistione di materiali d'arricchimento complementari non prettamente classificabili come materiale ottimale potrebbe fornire risultati interessanti e risulta necessario eseguire ulteriori studi.
I presenti risultati confermano quanto esposto in bibliografia e concordano con le scelte della classificazione delle Linee guida nazionali che pongono sul medesimo piano (insufficiente) l'assenza di materiale, la presenza di materiale sporco o non disponibile, la presenza di un solo materiale marginale o un solo materiale sub-ottimale.
La scelta della qualità del materiale manipolabile e del relativo utilizzo-quantità risulta fondamentale per un corretto approccio alla prevenzione delle lesioni da aggressione sia al corpo che da morsicatura alle orecchie e alle code. In conclusione, nell'ottica di allevare suini a coda integra, come sancito dal D.L.vo 122/2011, risulta fondamentale affrontare un'accurata valutazione del rischio che conduca ad un'adeguata scelta dei materiali d'arricchimento ad hoc per ogni singola realtà aziendale.

BIBLIOGRAFIA

1. Bottacini M., Scollo A., Edwards S., Contiero B., Veloci M., Pace V. and Gottardo F. (2018). Skin lesion monitoring at slaughter on heavy pigs (170 kg): Welfare indicators and ham defects. PLoS ONE 13, 1–16.
2. EFSA (European Food Safety Authority) (2012) "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.
3. Kongsted H. and Sørensen J.T. (2017). Lesions found at routine meat inspection on finishing pigs are associated with production system. Veterinary Journal 223, 21–26.
4. Linee guida (2018) "Linee guida per la prevenzione del taglio della coda nell'allevamento suino dallo svezzamento all'ingrasso". Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" - Centro di Referenza Nazionale per il Benessere Animale. Via Antonio Bianchi, 9 - 25124 Brescia – ITALY
5. Available at http://www.classyfarm.it/wp-content/uploads/sites/4/2018/08/Manuale-linee-guida-rischio-taglio-coda.pdf
6. 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.
7. Scollo A., Contiero B. and Gottardo F. (2016). Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight. Veterinary Journal 207, 92–98
8. SWD 49 (2016) "Commission staff working document on best practices with a view to the prevention of routine tail-docking and the provision of enrichment materials to pigs". European Commission. Bruxelles, 8.3.2016.
9. Available at https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/aw_practice_farm_pigs_stfwrkdoc_en.pdf
10. Van Staaveren N., Doyle B., Manzanilla E.G., Calderón Díaz J.A., Hanlon A. and Boyle L.A. (2017). Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs. Journal of Animal Science 95, 1528–1536.
11. WQ (Welfare Quality® Protocol) (2009) "Welfare Quality® Assessment Protocol for pig (sows and piglets, growing and finishing pigs)". Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.
12. Available at http://www.welfarequalitynetwork.net/downloadattachment/45627/21651/Pig%20Protocol.pdf

Tab. 2 – Prevalenze totali di ABMs, rilevate in allevamento, in relazione al tipo di materiale di arricchimento suddivise per categorie di peso.
Tab. 2 – Overall prevalence of ABMs in relation to the type of enrichment material divided into weight category.

6-35Kg					
Materiale manipolabile	**Soggetti**	**Lesioni Corpo lievi**	**Lesioni Corpo gravi**	**Lesioni Morsicatura Coda**	**Comportamento esplorativi materiali d'arricchimento**
Non valutabile	413	1,5%	0,2%	0,0%	/
Marginale	564	3,9%	0,0%	0,0%	6,0%
Sub-ottimale	552	6,2%	0,5%	0,2%	9,8%
Ottimale	505	0,8%	0,0%	0,6%	15,6%
Totale - Prevalenza	2034	3,2%	0,2%	0,2%	8,2%
36-70kg					
Materiale manipolabile	**Soggetti**	**Lesioni Corpo lievi**	**Lesioni Corpo gravi**	**Lesioni Morsicatura Coda**	**Comportamento esplorativi materiali d'arricchimento**
Non valutabile	1221	7,9%	0,2%	0,0%	/
Marginale	715	7,3%	0,0%	0,4%	3,5%
Sub-ottimale	1503	8,1%	0,3%	0,0%	3,7%
Ottimale	85	4,7%	0,0%	1,2%	3,5%
Totale - Prevalenza	3524	7,8%	0,2%	0,1%	2,4%
>70Kg					
Materiale manipolabile	**Soggetti**	**Lesioni Corpo lievi**	**Lesioni Corpo gravi**	**Lesioni Morsicatura Coda**	**Comportamento esplorativi materiali d'arricchimento**
Non valutabile	3052	7,0%	0,1%	0,1%	/
Marginale	1330	7,1%	0,5%	0,1%	4,4%
Sub-ottimale	3191	6,1%	0,2%	0,2%	2,5%
Ottimale	660	1,2%	0,0%	0,0%	12,7%
Totale - Prevalenza	8233	6,2%	0,2%	0,1%	2,7%
Generale					
Materiale manipolabile	**Soggetti**	**Lesioni Corpo lievi**	**Lesioni Corpo gravi**	**Lesioni Morsicatura Coda**	**Comportamento esplorativi materiali d'arricchimento**
Totale - Prevalenza	13791	6,19%	0,20%	0,12%	3,44%

LE BASI COMPORTAMENTALI DELLA MORSICATURA DELLA CODA: RISVOLTI PRATICI NELL'ALLEVAMENTO INTENSIVO

THE BEHAVIORAL BASES OF TAIL BITING: PRACTICAL APPROACHES IN INTENSIVE FARMING

A. SCOLLO
Libero professionista Suivet

Parole chiave: Morsicatura della coda, comportamento
Key words: *Tail biting, behaviuor*

RIASSUNTO: La morsicatura della coda è un problema ben noto nella produzione suinicola ormai da decenni, soprattutto ora che si parla così spesso di abolizione del taglio della coda. Il presente lavoro presenta una brevissima carrellata di comportamenti e basi etologiche descritti dalla bibliografia, con lo scopo di focalizzare l'attenzione su aspetti da osservare normalmente secondari nella realtà produttiva, ma che diventano primari nell'allevamento intensivo quando si vuole ridurre il rischio di morsicatura.

ABSTRACT: *Tail biting has been a well-known problem in pig production for decades, especially now that we often talk about abolishing tail docking. The present work presents a very brief overview of behaviors and ethological bases described in the bibliography, with the aim of focusing attention on aspects normally observed secondary in the production reality, but which become primary in intensive farms when the goals is reducing the risk of biting.*

INTRODUZIONE

La morsicatura della coda è un problema ben noto nella produzione suinicola ormai da decenni. In questo contesto, il morsicatore è definito come un soggetto che manipola oralmente la coda di un altro maiale compagno di box, ed il fenomeno si verifica sia che gli animali abbiano la coda tagliata sia che ce l'abbiano non tagliata (EFSA, 2007). È evidente però che i suini con la coda lunga siano più soggetti a fenomeni di morsicatura, in particolare se si parla di allevamento del suino intensivo in ambienti tipicamente spogli e privi di stimoli. La morsicatura della coda e le conseguenti lesioni purtroppo causano forte stress nel suino e riducono il suo benessere così come la sua salute e la sua produttività (Schroder-Petersen, and Simonsen, 2001). Infatti, le ferite alla coda possono tradursi in un problema economico perché strettamente connesse con mortalità, ridotti incrementi ponderali e potenziale perdita al macello della carcassa o di una parte di essa. Pertanto, la prevenzione della morsicatura della coda è importante per la redditività aziendale, così come per il miglioramento del benessere degli animali, sia in caso di animali a coda lunga che a coda tagliata. Sebbene sia le richieste legislative che le pressioni dei consumatori richiedano che i maiali vengano allevati abolendo il taglio della coda, il più recente report pubblicato dal consiglio dell'EFSA (2007) sulla situazione europea mostra che il 90-95% dei suini in Unione Europea è ancora allevato con la coda tagliata per ridurre il rischio e le conseguenze di morsicatura (D'Eath et al., 2016; Lerner e Algers, 2013), proprio a causa di un aumentato rischio di morsicatura negli animali a coda lunga. È evidente dunque che siano necessari dei protocolli di gestione da adottare nelle aziende suinicole ancora prima di decidere di allevare suini a coda lunga, per evitare spiacevoli episodi di morsicatura; solo allora si potrà realisticamente parlare di abbandono unanime di questa mutilazione in tutta Europa (Lahrman et al., 2017).

Anche se la mancanza di occupazione è risultata essere uno dei principali fattori di rischio per lo sviluppo di cannibalismo nei suini (EFSA, 2007), il contesto causale dei focolai di morsicatura è complesso e non è ancora stato pienamente compreso. Certamente la morsicatura della coda è un comportamento reindirizzato che origina da un comportamento esplorativo insoddisfatto (Bolhuis et al., 2005). Tuttavia, il fenomeno è multifattoriale, con molti altri fattori che hanno un impatto sulla sua insorgenza, come la genetica, il tipo di alimentazione ed il microclima ambientale (Taylor et al., 2010). Purtroppo, oltre ad essere estremamente difficile da prevedere, il fenomeno è ancora più difficile da fermare dopo che si è manifestato (D'Eath et al., 2014). Fraser (1987) trovò che i maiali mostrano una maggiore attrazione nel mordere le code dei compagni di box quando cominciano a sentire il sapore del sangue, anche se questa attrazione per il sangue è altamente individuale. Questo fenomeno è considerato parte della spiegazione del perché piccole ferite alla coda possano portare a diffuse "epidemie" di morsicatura in un breve periodo di tempo.
Poiché l'insorgenza di morsicatura può instaurarsi molto rapidamente ed è difficile da fermare, particolare attenzione sul campo deve essere focalizzata sulla minimizzazione dei fattori di rischio aziendali. È stato ipotizzato che se il comportamento di morsicatura viene rilevato precocemente, cioè prima che compaiano gravi ferite di coda, un cambiamento nella gestione potrebbe inibire un grave focolaio. Purtroppo però spesso il comportamento di morsicatura non viene rilevato fino a quando non sono presenti evidenti lesioni della coda, il che aumenta esponenzialmente la difficoltà di fermare i focolai (Zonderland et al., 2009). Ecco perché concentrarsi sul comportamento dei suini e sulle basi etologiche di ciascun atteggiamento può essere uno strumento molto utile nella quotidianità di allevamento, sebbene sia una assoluta novità per un settore non abituato a soffermarvi l'attenzione.
Il presente lavoro presenta una brevissima carrellata di comportamenti descritti da altri autori, con lo scopo di focalizzare l'attenzione su aspetti da osservare normalmente secondari ma che diventano primari nell'allevamento intensivo quando si vuole ridurre il rischio di morsicatura e migliorare così anche la produttività.

La morsicatura a due fasi: il morsicatore per noia

I primi a parlare di morsicatura a due fasi sono Fraser e Broom (1990), che descrivono in modo specifico una prima fase di "pre-danno" ed una seconda di vera e propria lesione. Durante la prima fase, un maiale esplora delicatamente la coda di un altro suino con la bocca, e la manipola inizialmente senza causare danni evidenti o stress nel destinatario. Questo comportamento è tollerato dal suino destinatario e viene spesso osservato quando entrambi i soggetti sono sdraiati o inattivi (Schrøder-Petersen et al., 2004). Schrøder-Petersen e Simonsen (2001) definiscono questa prima fase con il termine "*tail-in-mouth*" ("coda-in-bocca"). A questa prima fase non necessariamente segue la seconda, quella dannosa. La transizione alla fase dannosa non è ben documentata, ma si suppone che ad un certo punto (probabilmente durante un periodo di noiosa e protratta suzione della coda, questa si lesioni accidentalmente (Fraser e Broom, 1990; Schrøder-Petersen et al., 2003). Una volta che la coda è sanguinante, il problema può rapidamente degenerare perchè altri maiali acquisiscono interesse per le code (Fraser, 1987).
Nonostante le numerose osservazioni che non seguono questo schema, questo processo a due stadi è attualmente considerata l'ontogenesi della morsicatura della coda nella maggior parte dei casi.
Perché i suini manifestano questo comportamento
Il comportamento manifestato nella prima fase non è dannoso ed è considerato normale estensione del comportamento naturale dei suini che esplorano l'ambiente per trovare alimenti. Newberry et al. (1988) suggeriscono che il trasferimento di questo comportamento

sulle code è un'abitudine che si sviluppa in alcuni individui, ma non ha nulla a che fare con modelli tipici di conflitti tra suini, aggressività o comportamenti combattivo, che tipicamente culminano invece con morsi inflitti intorno alle spalle ed alla parte anteriore del corpo dell'animale (Barrette, 1986).
La morsicatura a due fasi si può manifestare sia sulle code che sulle orecchie. Talvolta alcuni box presentano la problematica sulle code, ed altri box nella stessa azienda la presentano sulle orecchie (Blackshaw, 1981). I singoli suini possono favorire un sito rispetto all'altro o possono arrivare a mordere entrambi (Beattie et al., 2005). Degli studi di Hunter et al. (1999) e di Goossens et al. (2008) hanno dimostrato che quando le code sono tagliate molto corte, il morso delle orecchie diventa più probabile. Sia la coda che le orecchie sembrano essere convenienti appendici da masticare, ma le orecchie, per la loro localizzazione più vicina alla testa sono probabilmente interpretate come destinatarie di un comportamento agonistico e più facilmente portano a conflitti i due animali.
Cosa fare in azienda
Impedire ai suini di sviluppare un interesse manipolatorio verso le code è la chiave per prevenire questa forma di morsicatura. Infatti, se non si assiste alla fase iniziale di lieve manipolazione, difficilmente si instaurerà la seconda. La prevenzione ed il controllo sono quindi basati sull'introduzione di materiali che permettano al suino di manifestare il suo comportamento esploratorio e di ricerca alimentare, senza incorrere nella noia che può portarlo a ridirigere la sua attenzione verso i compagni di box.

La morsicatura improvvisa: il morsicatore per frustrazione

Una seconda forma di morsicatura viene descritta da van Putten (1969), Fritschen e Hogg (1983), e Fraser and Broom (1990). Si tratta di un evento di morsicatura nel quale la coda di un maiale viene afferrata e strattonata con forza, generalmente senza un precedente periodo di manipolazione delicata. Le lesioni conseguenti a questo gesto possono essere anche molto gravi, e risultare nell'amputazione della punta della coda o parti di cute. Sostanzialmente si tratta di un episodio estremamente acuto di morsicatura, con decorso rapido e grave. È il caso per esempio di interi box senza alcuna lesione, che il giorno dopo presentano quasi tutte le code sanguinanti ed accorciate nella loro lunghezza, eccetto quella del morsicatore.
Perché i suini manifestano questo comportamento
Mordere la coda con forza ed improvvisamente si osserva più comunemente quando i maiali non sono in grado di accedere a una risorsa desiderata, come il truogolo (Georgsson e Svendsen, 2002; Morrison et al., 2007), ed accade più spesso quando gli animali sono in piedi o in movimento (Fritschen e Hogg, 1983). Sostanzialmente questa forma di morsicatura può essere considerata una sorta di atto aggressivo a causa di forte frustrazione (Widowski, 2002).
Cosa fare in azienda
Prevenire la morsicatura della coda improvvisa può richiedere l'identificazione di situazioni che possono portare a condizioni competitive/frustranti nelle interazioni tra maiali. Una serie di fattori può influenzare il livello di concorrenza tra individui per varie risorse tra cui la disponibilità quantitativa, spaziale e temporale di cibo, acqua, aree di decubito, spazio libero per la locomozione, elementi di arricchimento ambientale. Si suggerisce quindi di aumentare la disponibilità di queste risorse, in particolare cibo e acqua, ad esempio modificando il numero di mangiatoie (Hansen et al., 1982).
In questo tipo di morsicatura appare evidente come la rimozione precoce del morsicatore sia uno degli interventi più urgenti da fare in questi casi. Infatti, spesso è un unico soggetto ad innescare il problema e, se non rimosso velocemente, si rischia di incorrere in fenomeni di imitazione tra suini con il risultato di vedere moltiplicare i morsicatori nel box.

La morsicatura fanatica: il morsicatore per ossessione

Una terza forma distintiva di comportamento mordace può essere descritta come morsicatura ossessiva della coda, definita anche "morsicatura fanatica" (Beattie et al., 2005; Van de Weerd et al., 2005). In questa forma di cannibalismo, la coda viene morsicata con grande quantità di forza da parte di uno o pochi singoli animali che afferrano e strattonano le code, a volte rimuovendo porzioni di cute o amputando sezioni della coda, come nel comportamento di morsicatura improvvisa descritto sopra. Tuttavia, questo modello di comportamento differisce in quanto i morsicatori ossessivi sembrano essere focalizzati o fissati sulle code dei compagni di box, e cercano costantemente un'altra coda da mordere. Altra differenza è che il comportamento non è necessariamente mostrato in un contesto di competizione per le risorse che potrebbe indurre uno stato di frustrazione, sebbene uno stato di frustrazione potrebbe alla base all'innesco iniziale del comportamento.

Perché i suini manifestano questo comportamento

Il coinvolgimento di soggetti ossessivi per la morsicatura della coda nelle due forme precedentemente descritte non sono chiare; possono infatti essere responsabili di episodi spontanei di morsicatura oppure accelerare focolai già in atto a seguito della presenza di code lesionate a causa di una delle due precedenti eziologie. È possibile che alcuni individui possano mordere la coda improvvisamente per accedere ad una risorsa ma, trovando l'atto di mordere la coda più gratificante dell'accesso stesso alla risorsa, acquisiscano il desiderio di continuare cercare le code piuttosto che concentrarsi sul desiderio alimentare iniziale.

Cosa fare in azienda

L'intervento principale da mettere in atto in azienda deve essere quello di concentrarsi sull'identificazione dei soggetti ossessivi prima che si verifichi il comportamento di morsicatura, rimuovendoli dal gruppo precocemente. Un'osservazione interessante è che gli individui che diventano ossessivi sono spesso quelli che hanno subito delle problematiche di accrescimento, tale per cui solitamente sono i più piccoli del gruppo (Beattie et al., 2005; Van De Weerd et al., 2005; Edwards, 2006). Questa caratteristica può aiutare anche nell'individuazione dell'animale ossessivo all'interno del gruppo, ottimizzando il tempo necessario per rimuoverlo. È facile pensare che il comportamento insorga nei suini più piccoli per il loro tentativo di raggiungere le risorse in mezzo a soggetti più grandi e forti, ma in realtà sembra più probabile che il comportamento si sviluppi a causa di un'anomalia comportamentale che rientra nelle stereotipie, suggerendo un certo grado di alterazione patologica. Se i suini ossessivi sono i più piccoli del gruppo e quindi quelli che hanno manifestato problematiche di accrescimento, l'ipotesi che la problematica sia associata anche ad aspetti legati all'alimentazione non è da scartare (Holmgren e Lundeheim, 2004; Beattie et al., 2005). La morsicatura ossessiva potrebbe svilupparsi anche in animali con problemi di salute in un momento cruciale del loro sviluppo (come ad esempio lo svezzamento).

La posizione della coda come strumento di "diagnosi" di benessere

La posizione della coda è stata suggerita come un indicatore di morsicatura nel suino. Infatti, i maiali colpiti all'interno di un box dove è presente un morsicatore sono più inclini mantenere coda in una postura abbassata e nascosta tra i posteriori rispetto ai maiali senza stimoli stressogeni, che invece la tengono alta ed arrotolata sulla groppa (Kleinbeck e McGlone,1993). Questa osservazione di certo non è recente, perché già nel 1990 McGlone et al. la descrivevano, ma nel corso degli anni l'informazione è forse andata dimenticata a causa della completa assenza di code lunghe nell'allevamento intensivo moderno. La postura della coda è stata suggerita come espressione di una misura protettiva, oltre a essere mezzo di comunicazione dei maiali (Kleinbeck e McGlone,1993; McGlone et al., 1990). Ad esempio, i maiali stressati dal calore possono avere più probabilità di avere code basse, mentre i maiali

che interagiscono con una persona a loro familiare, che sperimentano uno stato mentale positivo, solitamente hanno la coda arricciata.

Nei suinetti in svezzamento, è stato dimostrato che la postura della coda è correlata alle lesioni della coda e che coda bassa può essere un segnale predittivo di lesioni che si verificano 2-3 giorni dopo il manifestarsi della postura (Zonderland, 2003). Secondo Lahrmann et al. (2018), addirittura il numero di maiali con le code basse osservate durante un giorno erano correlate al numero di lesioni osservate il giorno successivo.

Uno studio recentissimo (Wallgren et al., 2019) ha approfondito l'aspetto posturale della coda applicandolo sul campo. Il momento più efficace per l'operatore per controllare gli animali è spesso il pasto, e poter correlare la postura della coda con il rischio di morsicatura rilevando il dato durante la distribuzione della broda permetterebbe di ottimizzare i tempi di controllo, in quanto si associa la rilevazione delle code al giro di ispezione quotidiano già effettuato per gli aspetti sanitari. Lo studio sembra confermare la fattibilità dell'ipotesi, perché sembra che la coda pendente all'alimentazione sia significativamente correlata alla presenza di ferite e infiammazione. I maiali con lesioni alla coda avevano una probabilità quattro volte maggiore di avere code basse rispetto ai maiali con la coda integra, mentre i suini con grave infiammazione presentavano una probabilità addirittura 14 volte maggiore. Solo considerando la posizione della coda durante l'alimentazione, il 78% dei suini ha potuto essere classificato correttamente come lesionato o con stato infiammatorio in atto. I risultati suggeriscono che, anche se la posizione della coda durante il pasto non è perfettamente precisa nell'identificazione degli animali morsicati, è un'osservazione molto utile e fattibile in circostanze commerciali per ottimizzare i tempi di controllo degli animali.

La postura della coda è stata confermata anche predittiva di fenomeni di morsicatura che devono ancora instaurarsi, con anticipo dell'evento di morsicatura di circa tre giorni (Lahrmann, et al., 2018). Questo permette di poter prevedere delle problematiche in allevamento prima ancora di avere delle lesioni alla coda. Studi recentissimi hanno perfino ipotizzato delle strumentazioni video che registrano la postura delle code degli animali nei box e, tramite calcoli matematici, ipotizzano una soglia di allarme oltre la quale l'allevatore viene avvisato del rischio di morsicatura (D'Eath et al, 2018), facendo rientrare il fenomeno della morsicatura della coda in uno di quei parametri monitorati dalla strumentazione che sta portando l'allevamento intensivo del suino verso un allevamento "di precisione".

BIBLIOGRAFIA

1. Barrette, C., 1986. Fighting behavior of wild Sus Scrofa. Journal of Mammalogy 67, 177–179.
2. Beattie, V.E., Breuer, K., O'Connell, N.E., Sneddon, I.A., Mercer, J.T., Rance, K.A., Sutcliffe, M.E.M., Edwards, S.A., 2005. Factors identifying pigs predisposed to tail biting. Animal Science 80, 307–312.
3. Blackshaw, J.K., 1981. Some behavioral-deviations in weaned domestic pigs – persistent inguinal nose thrusting, and tail and ear biting. Animal Production 33, 325–332.
4. Bolhuis, J.E.; Schouten, W.G.P.; Schrama, J.W.; Wiegant, V.M. Behavioural development of pigs with different coping characteristics in barren and substrate-enriched housing conditions. Appl. Anim. Behav. Sci. 2005, 93, 213–228.
5. D'Eath, R. B., Jack, M., Futro, A., Talbot, D., Zhu, Q., Barclay, D., & Baxter, E. M. (2018). Automatic early warning of tail biting in pigs: 3D cameras can detect lowered tail posture before an outbreak. PloS one, 13(4).
6. D'Eath, R.B.; Arnott, G.; Turner, S.P.; Jensen, T.; Lahrmann, H.P.; Busch, M.E.; Niemi, J.K.; Lawrence, A.B.; Sandoe, P. Injurious tail biting in pigs: How can it be controlled in existing systems without tail docking? Animal 2014, 8, 1479–1497.

7. D'Eath, R.B.; Niemi, J.K.; Ahmadi, B.V.; Rutherford, K.M.D.; Ison, S.H.; Turner, S.P.; Anker, H.T.; Jensen, T.; Busch, M.E.; Jensen, K.K.; et al. Why are most EU pigs tail docked? Economic and ethical analysis of four pig housing and management scenarios in the light of EU legislation and animal welfare outcomes. Animal 2016, 10, 687–699.
8. Edwards, S.A., 2006. Tail biting in pigs: understanding the intractable problem. The Veterinary Journal 171, 198–199.
9. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare on a request from 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 J. 2007, 611, 1–13.
10. Fraser, D. Attraction to Blood as a Factor in Tail-Biting by Pigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 1987, 17, 61–68.
11. Fraser, D., Broom, D.M., 1990. Farm Animal Behaviour and Welfare, third ed. Baillière Tindall, London. pp. 327–328.
12. Fritschen, R., Hogg, A., 1983. Preventing Tail Biting in Swine, NebGuide, G75-246. University of Nebraska, Lincoln.
13. Georgsson, L., Svendsen, J., 2002. Degree of competition at feeding differentially affects behavior and performance of group-housed growing–finishing pigs of different relative weights. Journal of Animal Science 80, 376–383.
14. Goossens, X., Sobry, L., Odberg, F., Tuyttens, F., Maes, D., De Smet, S., Nevens, F., Opsomer, G., Lommelen, F., Geers, R., 2008. A population-based on-farm evaluation protocol for comparing the welfare of pigs between farms. Animal Welfare 17, 35–41.
15. Hansen, L.L., Hagelso, A.M., Madsen, A., 1982. Behavioural results and performance of bacon pigs fed 'ad lib' from one or several feeders. Applied Animal Ethology 8, 307–333.
16. Holmgren, N., Lundeheim, N., 2004. Risk Factors in Tail Biting. International Pig Veterinary Society, Hamburg, Germany. p. 786.
17. Hunter, E.J., Jones, T.A., Guise, H.J., Penny, R.H.C., Hoste, S., 1999. Tail biting in pigs 1: the prevalence at six UK abattoirs and the relationship of tail biting with docking, sex and other carcass damage. The Pig Journal 43, 18–32.
18. Kleinbeck, S.; McGlone, J.J. Pig Tail Posture: A Measure of Stress; Texas Tech University Agricultural Science Technical Report No.-T-327; Texas Tech University: Lubbock, TX, USA, 1993; pp. 47–48.
19. Lahrmann, H.P.; Busch, M.E.; D'Eath, R.B.; Forkman, B.; Hansen, C.F. More tail lesions among undocked than tail docked pigs in a conventional herd. Animal 2017, 11, 1825–1831.
20. Lahrmann, H.P.; Hansen, C.F.; D'Eath, R.; Busch, M.E.; Forkman, B. Tail posture predicts tail biting outbreaks at pen level in weaner pigs. Appl. Anim. Behav. Sci. 2018, 200, 29–35.
21. Lerner, H.; Algers, B. Tail docking in the EU: A case of routine violation of an EU Directive. In The Ethics of Consumption; Röcklinsberg, H., Sandin, P., Eds.;Wageningen Academic Publishers: Wageningen, The Netherlands, 2013.
22. McGlone, J.J.; Sells, J.; Harri, S.; Hurst, R.J. Cannibalism in Growing Pigs: Effects of Tail Docking and Housing System on Behaviour, Performance and Immune Function; Texas Tech University Agricultural Science Technical Report No. T-5-283; 1990; Volume 283, pp. 69–71.
23. Morrison, R.S., Johnston, L.J., Hilbrands, A.M., 2007. A note on the effects of two versus one feeder locations on the feeding behaviour and growth performance of pigs in a deep-litter, large group housing system. Applied Animal Behaviour Science 107, 157–161.
24. Newberry, R.C., Wood-Gush, D.G.M., Hall, J.W., 1988. Playful behavior of piglets. Behavioural Processes 17, 205–216.
25. Schrøder-Petersen, D.L., Heiskanen, T., Ersboll, A.K., 2004. Tail-in-mouth behaviour in slaughter pigs, in relation to internal factors such as: age, size, gender, and motivational background. Acta Agriculturae Scandinavica Section A – Animal Science 54, 159–166.
26. Schrøder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., 2001. Tail biting in pigs. The Veterinary Journal 162, 196–210.
27. Schrøder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., Lawson, L.G., 2003. Tail-in-mouth behaviour among weaner pigs in relation to age, gender and group composition regarding gender. Acta Agriculturae Scandinavica Section A Animal Science 53, 29–34.
28. Schroder-Petersen, D.L.; Simonsen, H.B. Tail biting in pigs. Vet. J. 2001, 162, 196–210.
29. Taylor, N.R.; Main, D.C.J.; Mendl, M.; Edwards, S.A. Tail-biting A new perspective. Vet. J. 2010, 186, 137–147.
30. Van de Weerd, H.A., Docking, C.M., Day, J.E.L., Edwards, S.A., 2005. The development of harmful social behaviour in pigs with intact tails and different enrichment backgrounds in two housing systems. Animal Science 80, 289–298.
31. van Putten, G., 1969. An Investigation into tail-biting among fattening pigs. British Veterinary Journal 125, 511–517.
32. Wallgren T., Larsen A. and Gunnarsson S., 2019. Tail Posture as an Indicator of Tail Biting in Undocked Finishing Pigs. Animals 2019, 9, 18; doi:10.3390/ani9010018.
33. Widowski, T.M., 2002. Causes and prevention of tail biting in growing pigs: a review of recent research. In: London Swine Conference – Conquering the Challenges. London, Ontario, pp. 47–56.
34. Zonderland, J.J.; Fillerup, M.; Reenen, C.G.; Hopster, H.; Spoolder, H.A.M. Preventie en Behandeling van Staartbiljten Bij Gespeende Biggen; Wageningen UR: Animal Sciences Group: Lelystad, The Netherlands, 2003.
35. Zonderland, J.J.; van Riel, J.W.; Bracke, M.B.M.; Kemp, B.; den Hartog, L.A.; Spoolder, H.A.M. Tail posture predicts tail damage among weaned piglets. Appl. Anim. Behav. Sci. 2009, 121, 165–170.

INDAGINE SULLA PRESENZA, PREVALENZA, TIPOLOGIA, MANIFESTAZIONI CLINICHE E ANTIBIOTICO SENSIBILITÀ DI STREPTOCOCCUS SUIS IN UNA FILIERA PRODUTTIVA NEGLI ANNI 2010-2018

SURVEY ON PRESENCE, PREVALENCE, SEROTYPE, CLINICAL EVIDENCE AND AB SENSITIVITY OF STREPTOCOCCUS SUIS IN A LARGE PIG PRODUCTION SYSTEM IN YEARS 2010-2018

SANDRI G.[1], GIOVANARDI D.[2], PESENTE P.[2], ROSSI G.[2], NIERO G.[2]

[1]Soc. Agr. La Pellegrina Spa/Gruppo Veronesi; [2]Laboratorio Tre Valli/Gruppo Veronesi

Parole chiave:*Streptococcus suis*, tipo capsulare, fattori di virulenza, multiplex PCR, antibioticosensibilità
Key words: *Streptococcus suis*, capsular type, virulence factors, multiplex PCR, antimicrobial sensitivity

RIASSUNTO: *Streptococcus suis* è uno dei patogeni batterici che più frequentemente induce forme cliniche nella fase del post svezzamento. Sebbene ampiamente diffuso e presente al livello mondiale con oltre trenta sierotipi diversi, solo alcuni sierotipi sono responsabili di forme cliniche quali meningite, setticemia e artrite. Per evidenziare se e quali fossero i sierotipi presenti all'interno delle filiere di un sistema di produzione integrato è stato fatto uno studio della durata di nove anni che ha catalogato e messo in correlazione origine dei casi, quadri clinici, risultati batteriologici, presenza di fattori di virulenza e sensibilità agli antimicrobici. Dall'analisi dei dati raccolti emerge che il tipo capsulare nella maggior parte dei casi non risulta essere tipizzabile con gli strumenti e le tecniche a disposizione. Tra quelli tipizzati quello più frequentemente isolato è il tipo 9, seguito dal tipo 2 seppur con una certa variabilità tra le fasi produttive . La maggior parte degli isolati ha mostrato un profilo Arc/mrp/Sly + o comunque ha confermato la presenza di uno o più fattori di virulenza. Non è invece stato possibile stabilire una correlazione univoca per sierotipo e/o patotipo intra e inter filiera. Il monitoraggio della sensibilità agli antibatterici negli ultimi 10 anni ha confermato come gli antibiotici betalattamici abbiano mantenuto nel tempo un ottimo livello di sensibilità confermandoli come molecole di prima scelta per un intervento terapeutico.

ABSTRACT: *Streptococcus suis* is definitely one of the most frequently isolated bacteria inducing severe clinical pictures in the post weaning stage. Although present worldwide with over 30 different serotypes, only few among these are able to induce clincal pictures like meningitis, septicemia and arthritis. In order to understand if and which were the serotypes possibly circulating in the different flows of a large integrated production system a sudy was carried over during a nine years long period correlating the origin of the isolates, the clinical pictures, bacteriology results, presence of virulence factors and antimicrobial sensitivity. Collected data confirm that in most of the cases it is impossible to determine the capsular type with the available tools/techniques. Among those classified the most frequentl isolate is type 9 followed by type 2 though with quite some variation among stages. Most of the isolates showed a Arc/mrp/Sly + profile or anyhow confirmed the presence of at least one or more virulence factors. On the contrary it was impossible to establish a one way correlation with a certain sertype along a determinate flow or even among different flows.

Monitoring antimicrobial sensitivity during the last 10 years highlighted how betalactamic antibiotics maintained a very high sensitivity in time confirming these molecules as first choice for therapy.

INTRODUZIONE

Anche se *Streptococcus suis* può essere responsabile di problemi clinici durante tutta la vita produttiva del suino questo batterio è il patogeno più frequentemente isolato nei suinetti svezzati insieme a ETEC *E. coli*. A livello mondiale sono stati descritti/segnalati molti differenti tipi capsulari di *S. suis* ma solo un numero limitato di questi causano problemi clinici significativi. Lo scopo di questo studio è descrivere i risultati di un'indagine epidemiologica condotta nelle filiere di un grande sistema produttivo multisede italiano, durata nove anni, mostrando la distribuzione dei sierotipi e patotipi e cercando di evidenziare correlazioni tra sierotipo, fase produttiva e organo/materiale da cui veniva effettuato l'isolamento. Nell'ambito dello studio è stata anche analizzata l'evoluzione nel tempo del pattern dell'Antibiotico Sensibilità nei confronti di *Streptococcus suis*.

MATERIALI E METODI

Utilizzando un sistema di estrazione dati sono stati analizzati i risultati relativi agli isolamenti di *Streptococcus suis* effettuati dal Laboratorio Tre Valli nel periodo compreso tra il 2010 e il 2018. Di ogni conferimento da cui veniva isolato il patogeno veniva registrata l'età e la tipologia di soggetto (SCR-SV-INGR), gli organi o distretti anatomici/tessuti di isolamento, la eventuale compresenza di altri patogeni di natura batterica e/o virale. E' stato inoltre possibile registrare l'origine (filiera di origine) dei suini per verificare se qualche sierotipo potesse prevalere all'interno di una specifica filiera. I visceri selezionati sono stati analizzati in piastre agar (Blood Agar Base, OXOID, Themofisher Scientific, UK) addizionate di sangue di montone al 3%. Dopo inoculo le piastre sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. Durante la lettura delle piastre di agar sangue, colonie sospette di *Streptococcus suis,* selezionate sulla base della loro morfologia e loro emolisi viridante (alpha- emolisi), sono state trapiantate su agar sangue per ulteriori analisi. Le colonie, con morfologia ed emolisi non tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a indagini biochimiche utilizzando la galleria miniaturizzata API Rapid ID 32 STREPT (bioMèrieux, Francia). Le colonie che non presentavano profilo biochimico corrispondente a quello di *Streptococcus suis* sono state eliminate. Tra le colonie isolate, solamente quelle presentanti morfologia ed emolisi tipiche di *Streptococcus suis*, sono state sottoposte a test di sieroagglutinazione rapida su vetrino utilizzando sei antisieri commerciali (Streptococcus suis type serum 1, 2, 4, 7, 9, 12 – SSI Diagnostica, Statens Serum Institute, Danimarca.

Per verificare la sensibilità antibiotica di *Streptococcus suis* le colonie isolate, con morfologia ed emolisi tipiche, sono state sottoposte ad antibiogramma, utilizzando il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) nei confronti di diversi principi attivi. Tra questi quelli più utilizzati sono Ampicillina (OXOID), Amoxicillina (OXOID), Amoxicillina + Ac. clavulanico(OXOID) e Ceftiofur (OXOID). Altri antibiotici, meno o non utilizzati per il trattamento specifico delle patologie da Streptococco, quali Trimethoprim-sulfametossazolo (OXOID), Lincomicina (OXOID), Florfenicolo (Merck), Enrofloxacina (Bayer) e Doxiciclina (OXOID) sono stati egualmente testati per verificare un'eventuale variazione di sensibiltà nel tempo, seppur in un arco temporale più breve. Dopo inoculo di colonie isolate in Mueller-Hinton brodo (OXOID) e incubazione a 37 ± 1 °C per quattro ore in condizioni di aerobiosi, la sospensione batterica è stata diluita per raggiungere la torbidità di 0,5 McFarland. Con tale sospensione, sono state inoculate piastre di Mueller-Hinton agar (OXOID) addizionate di sangue di montone al 3% ed incubate, in condizioni di aerobiosi, a 37 ± 1 °C per 4 ore. La valutazione degli aloni d'inibizione - così come la loro interpretazione (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) - è stata eseguita da lettore computerizzato SIRSCAN micro (I2A, Francia).

Alcuni degli isolati di *S. suis* sono anche stati analizzati in multiplex-PCR per la ricerca dei geni correlati alla produzione di fattori di virulenza. In particolare sono stati ricercati i geni codificanti i polisaccaridi della capula *cps1* (per i sierotipi 1 e 14), *cps2* (per i sierotipi 2 e 1/2), *cps7* (per il sierotipo 7), *cps9* (per i sierotipo 9), i geni per la proteina EF e le sue varianti (*epf, epf*),* i geni per la proteina suilisina *(sly),* i geni per la proteina MRP e le sue varianti *(mrp, mrp** and *mrp^s*), e il gene per la proteina arginina deaminasi (*arc).*

RISULTATI

Nel periodo preso in considerazione (2010-2018) *Streptococcus suis* è stato isolato in ben 910 occasioni da materiale (carcasse/organi/tessuti/tamponi) conferito al Laboratorio Tre Valli per un sospetto clinico riferibile al patogeno oggetto di studio o da "patologie miste". Tutti gli isolati (100%) sono stati sottoposti al test di antibiotico sensibilità. Per 746 isolati/isolamenti (82%) si è proceduto alla successiva sierotipizzazione. Solamente nel 6,8% dei casi (51/746) gli isolati selezionati sono stati sottoposti a multiplex PCR per confermare/smentire il sierotipo e individuare il patotipo.

Solo il 6,3% degli isolati proveniva da suinetti sotto-scrofa. Ben il 77,61% (579/746) degli isolati proveniva invece da Siti 2, ovvero da soggetti in fase post-svezzamento (età da 3-4 a 10-11 settimane di vita); questo a confermare come sia proprio questa la fase produttiva maggiormente colpita da questa patologia. I restanti conferimenti (120/746), pari al 16,08% , provenivano invece da soggetti in fase di magronaggio/ingrasso (Grafico 1).

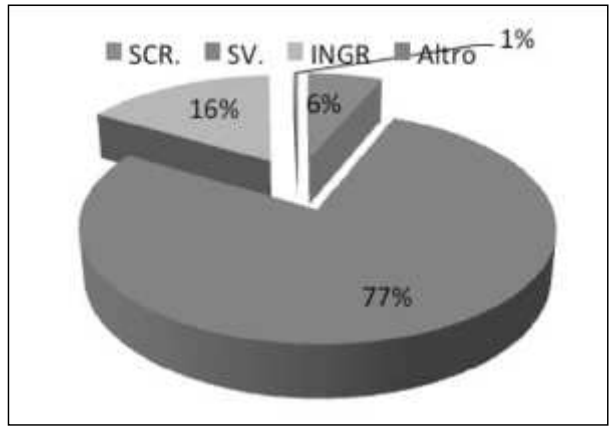


Grafico 1. Origine degli isolati/ Origin of isolates

Ben il 53% degli isolati sottoposti a un indagine per determinare il sierotipo sono risultati non tipizzabili (NT) con i metodi a disposizione confermando così quanto ampia possa essere la gamma dei tipi capsulari presenti negli allevamenti italiani. Il tipo capsulare più rappresentato è il tipo 9 (22%), seguito a distanza dal tipo 2 (9%) e dal tipo 1-2 (8%). Gli altri sierotipi maggiormente isolati sono il tipo 7 (7%), il tipo 4 (6%) e il tipo 1 (5%). Sebbene non richiesta/eseguita routinariamente la determinazione del patotipo ha confermato che quello più frequentemente isolato è il profilo Arc/mrp/Sly +.

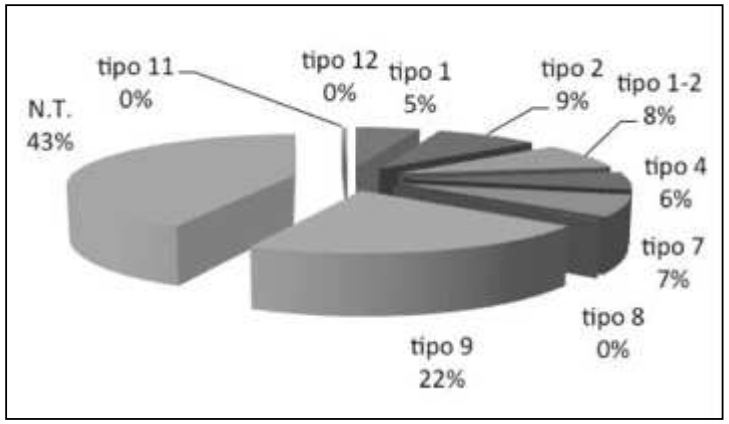


Grafico 2. Prevalenza sierotipi 2010-2018/Prevalence of serotypes 2010-2018

Nell'analisi della prevalenza dei sierotipi identificati nelle fasi sottoscrofa, svezzamento e ingrasso emergono piccole differenze che, sebbene non sottoposte ad analisi statistica, non sembrano essere significative. In tutte le tre fasi prevale l'insieme dei non tipizzabili (NT). Nei suinetti lattanti il tipo 1-2 e il tipo 1 sono i secondi e terzi maggiormente prevalenti. In svezzamento il secondo sierotipo maggiormente isolato è di gran lunga il tipo 9 col 26%. Seguono a distanza, con differenze percentuali minime tra di loro, i sierotipi 1-2, 2 e 7. Nella fase ingrasso, sempre dopo i NT, sono il tipo 2 (14%) e il tipo 4 (12%) quelli prevalenti. Al di la di quei ceppi così detti Non Tipizzabili (NT) – che abbiamo visto essere ampiamente prevalenti in tutte le fasi e quindi in praticamente tutte le filiere - non è stato invece possibile individuare un "sierotipo prevalente" all'interno di alcuna delle filiere considerate.

Il cervello è l'organo da cui *Streptococcus suis* è stato frequentemente isolato (181/746 conferimenti); in media nel 40,2% dei casi provenienti dallo svezzamento, nel 26,7% dei casi provenienti dalla sala parto e solo nel 3,3% dei casi provenienti dall'ingrasso. Nell' 8,8% di questi 181 casi *Streptococcus suis* è stato isolato anche dalle articolazioni mentre nel 22% dei casi l'isolamento è stato multiorgano (cervello, visceri quali fegato e milza, polmoni) indicando un evidente fenomeno di setticemia. Negli ultimi anni è cresciuta la frequenza con cui *Streptococcus suis* è stato isolato dai polmoni. Infatti in ben 321 casi su 730 records (43,97%) è risultato essere il solo patogeno batterico isolato dall'apparato respiratorio. Spesso quello effettuato da polmoni è risultato essere l'unico isolamento (270/321 =84,1%). La fase svezzamento è di gran lunga la fase produttiva da cui più spesso *S. suis* veniva isolato dal polmone.

In un indagine limitata ai soli ultimi tre anni (2016-17-18) – che comunque comprende 460 conferimenti – PRRSv è il patogeno virale più frequentemente isolato assieme a *S.suis.* col 25% dei casi. Molto meno frequente il co-isolamento di *S.suis* e Influenza (SIV) verificatosi solo nel 4,3% dei casi mentre in ben tredici occasioni (2,8%) sono stati confermati in compresenza *S.suis*, PRRSV e SIV.

Per quanto riguarda il fenomeno della antibiotico resistenza, nei nove anni presi in considerazione da questa indagine, non si è riscontrato nessun aumento significativo nei confronti delle tipologie di principio attivo più frequentemente usate per trattare le infezioni da *Streptococcus suis*. Infatti Ampicillina, Amoxicillina e Amoxicillina+ Ac.Clavulanico hanno segnato percentuali di resistenza molto basse rispettivamente del 4,3% , 2,1% e 2,5%. Al contrario si è evidenziata un'elevata percentuale di resistenza nei confronti dell'associazione sulfamidico + trimethoprim (>80-90% resistenti).

DISCUSSIONE

Quella indotta da Streptococcus suis è senza dubbio la patologia più frequentemente riscontrata nella fase del post svezzamento. Forme di meningite e polmonite, associate o meno nelle forme setticemiche, sono le manifestazioni cliniche più comuni. E' invece molto difficile – se non impossibile – associare queste forme a un particolare tipo capsulare/sierotipo. Al contrario ci sentiamo di affermare che, tra le varie/possibili cause scatenanti, la presenza di "instabilità" da presenza di PRRSv è sicuramente quella più importante.In tema di antibiotico sensibilità è incoraggiante vedere come i principi attivi più comunemente e frequentemente utizzati siano rimasti "attivi" nel tempo

CONCLUSIONI

Nonostante il sintomo clinico più frequentemente riportato sia la meningite, la grande maggioranza dei ceppi si è dimostrata in grado di essere molto invasiva essendo questi stati isolati da diversi organi/distretti. Negli ultimi anni Streptococcus suis sempre più spesso si è dimostrato essere un patogeno respiratorio di rilievo specialmente nella fase svezzamento e particolarmente quando accompagnato/scatenato da coinfezioni di natura virale quali quella da PRRSV e SIV. Poiché nel tempo sono stati isolati sierotipi diversi nelle stesse filiere ancora una volta non è stato possibile dimostrare una correlazione univoca tra la scrofaia (sito 1) di origine e i rispettivi siti 2 e siti 3 in termini di sierotipo. La presenza di molti ceppi per i quali non si è potuta definire una tipizzazione non è sicuramente fattore incoraggiante, tuttavia riteniamo importante proseguire il monitoraggio e la tipizzazione al fine di valutare il possibile, eventuale utilizzo di vaccini quali strumento di prevenzione. Per poter efficacemente trattare i soggetti colpiti è inoltre fondamentale proseguire il monitoraggio nel tempo della sensibilità di *S. suis* nei confronti degli antibatterici, ma gli antibiotici betalattamici possono ancora essere considerati di prima scelta in caso di necessità con fenomeni di resistenza molto limitati e sicuramente non in aumento negli anni.

BIBLIOGRAFIA

1. Higgins R., Gottschalk M. "Streptococcal Diseases" in Diseases of Swine 8th Edition, Iowa State University Press
2. Baums CG. (2013) "Pathogenesis, diagnosis and prophylaxis of Streptococcus suis diseases" in: 19 th Swine & Wine Meeting, Hamm-Kump, Germany, 25-27 October 2013
3. Silva L.M., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P. "Virulence-associated gene profiling of Streptococcus suis isolates by PCR Vet Microbiol. 2006 Jun 15;115(1-3):117-27.
4. Varela N.P., Gadbois P., Thibault C., Gottschalk M., Dick P., Wilson J. "Antimicrobial resistance and prudent drug use for Streptococcus suis" Anim Health Res Rev. 2013 Jun;14(1):68-77.
5. Sandri G. Giovanardi D., Pesente P., Rossi G. Streptococcus suis epidemiology (using serotyping and presence of virulence factors) and AMR (Antimicrobial Resistance) in a large pig production system in Italy. Proceedings of the 7th ESPHM Symposium Nantes, June,2015
6. Also in XLI SIPAS Meeting – Montichiari (BS), Italy March 19-120 2015

LA DETERMINAZIONE DELLA MIC COME STRUMENTO DECISIONALE NELLA SCELTA DELLA TERAPIA ANTIBIOTICA IN AMBITO SUINICOLO

MIC DETERMINATION AS A DECISION TOOL FOR ANTIMICROBIAL THERAPY IN SWINE INDUSTRY

VIO D., D'ESTE L., GAGLIAZZO L., USTULIN M., TAGLIENTE D., VICENZONI G.F.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: MIC, antibiotico resistenza, suino
Keywords: MIC, antibiotic resistance, swine

RIASSUNTO

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta una grave minaccia alla salute umana e animale; la corretta prescrizione delle terapie antibiotiche si è rivelata tra le iniziative più efficaci per contrastarla.
A partire da gennaio 2017 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe), come test di routine volto alla valutazione della sensibilità agli antimicrobici di ceppi batterici isolati nella routine diagnostica da animali da allevamento, ha introdotto la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC), abbandonando di fatto la metodica in piastra secondo Kirby-Bauer. Questo test offre informazioni più accurate e può diventare un utile strumento nella pratica veterinaria.
In aggiunta L'IZSVe ha messo a disposizione dei veterinari un database digitale che permette di accedere facilmente ai dati MIC degli allevamenti seguiti raccogliendone i dati storici e facilitando la scelta del protocollo terapeutico adeguato.

SUMMARY

The phenomenon of antimicrobial resistance has become a threat for both animal and human health; a correct antimicrobial prescription has shown to be one of the most successful initiatives to fight it.
Since January 2017 the IZSVe introduced determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique to test for antimicrobial susceptibility bacterial strains isolated from livestock animals during diagnostic routine, replacing the Kirby-Bauer method. This new test provides more accurate information about antimicrobial sensibility, and can be a very useful for private practice veterinarians.
Further IZSVe provides veterinarians a digital database where they can visualize all MIC results arranged according to each farm the veterinarian works at. This digital database allows veterinarians to check the clinical history of each farm and choose the most appropriate therapeutic protocol.

INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza è un fenomeno sempre più diffuso che si estrinseca nell'acquisizione della capacità di ceppi batterici di resistere all'attività di una o più classi di antibiotici con conseguente perdita di efficacia terapeutica delle stesse.
Nell'industria suinicola gli antibiotici vengono frequentemente utilizzati per il controllo di patologie enteriche, respiratorie e sistemiche, e la comparsa di ceppi batterici resistenti agli antibiotici può influenzare non solo la filiera di produzione della carne suina ma

avere un impatto sulla salute umana con il trasferimento tramite la catena alimentare di batteri resistenti e geni associati ad antibiotico resistenza (1). In quest'ambito il medico veterinario ha l'importante ruolo di garantire l'uso consapevole e appropriato della terapia antibiotica, la promozione della quale si è finora dimostrato una delle iniziative più efficaci al fine di prevenire e ridurre l'insorgenza e diffusione di fenomeni di antibiotico resistenza.

Per queste ragioni l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) ha introdotto, come metodo di routine per la valutazione dell'antibiotico-sensibilità, la determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) (2, 3, 4, 5, 6, 7) mediante micro diluizione in brodo. Questa tecnica permette di fornire informazioni più dettagliate al medico veterinario clinico ai fini di una corretta scelta del trattamento antibiotico. L'IZSVe fornisce inoltre un sistema di archiviazione e consultazione dei dati analitici prodotti dai laboratori che permette al medico veterinario responsabile di allevamento o di filiera di consultare in maniera rapida e semplice i dati di antibiotico sensibilità relativi agli allevamenti di cui è responsabile.

Lo scopo del presente contributo è condividere il funzionamento del sistema di gestione e utilizzo dei dati prodotti nell'attività diagnostica relativamente alle analisi di MIC e di dare una prima visione dei risultati ottenuti nell'ambito suinicolo.

MATERIALI E METODI

A partire dal 2 gennaio 2017 l'IZSVe ha sostituito nella propria routine diagnostica ai fini della valutazione della sensibilità agli antibiotici dei ceppi batterici, la metodica in piastra secondo Kirby-Bauer (KB) con la determinazione della MIC.

Il KB è una metodica di valutazione dell'antibiotico sensibilità di un ceppo batterico che fornisce esclusivamente un dato quantitativo (sensibile VS resistente). Questa metodica si basa sulla disposizione di dischetti di cellulosa impregnati di una quantità nota di farmaco antibiotico su una piastra Petri contenente un idoneo terreno di coltura su cui è stato seminato il ceppo batterico in esame. Durante l'incubazione della piastra il farmaco diffonde dal dischetto nel terreno circostante andando a inibire la replicazione batterica su un'area tanto più ampia quanto maggiore è l'efficacia del farmaco. In base all'ampiezza dell'alone di inibizione della crescita batterica attorno al dischetto, il ceppo in esame sarà definito sensibile o resistente all'antibiotico testato.

La MIC viene determinata invece inoculando un quantitativo noto del ceppo batterico in esame (10^5 Unità Formanti Colonia (UFC)) in brodi di crescita contenenti diluizioni scalari di antibiotico. La diluizione più elevata in grado di inibire la crescita batterica è definita Minima Concentrazione Inibente. La determinazione della MIC permette quindi di avere un dato quantitativo di sensibilità, utile per la scelta del farmaco più appropriato, tramite la comparazione dei valore di MIC rilevato per un determinato antibiotico e un determinato ceppo batterico con il valore di breakpoint (BP) che stabilisce il limite tra sensibilità e resistenza per quella classe di antibiotici e quella specie batterica.

Per facilitare il confronto tra le classi di antibiotici testate, l'IZSVe ha introdotto nell'esito, oltre al dato di MIC e al range di diluizioni testate, anche il quoziente, ovvero il rapporto tra i BP di sensibilità e la MIC rilevata. Tale rapporto (quoziente) permette di relativizzare il risultato analitico rilevato al BP rendendo immediatamente confrontabili i risultati ottenuti dalla MIC per diversi antibiotici.

A partire dai dati registrati nel LIMS (Laboratory Information Management System) aziendale (Izilab) è stato creato tramite Qlik Sense®, un prodotto di data visualization, un cruscotto di reportistica online che rende disponibile a ogni veterinario abilitato al sistema la possibilità di visualizzare tutta la propria attività legata alle MIC. L'accesso ai

dati è possibile a medici veterinari che abbiano conferito una quantità minima richiesta di campioni e che ne abbiano fatto richiesta. L'accesso viene garantito tramite username e password da qualsiasi dispositivo fisso o mobile dal sito https://www.izsvenezie.it/antibiotico-sensibilita-report-mic/. Accedendo al cruscotto sarà disponibile lo storico dei risultati delle MIC effettuate per ciascun allevamento, con il giudizio di sensibilità calcolato in base ai BP disponibili più recenti. Inoltre, grazie al motore associativo reso disponibile dal software e alla semplicità di esplorazione del dato, è possibile valutare con pochi click l'antibiotico più appropriato tra quelli per cui quel germe è risultato sensibile, scegliendo tra gli antibiotici che hanno il maggior numero di risultati con quoziente alto. I dati aggregati possono essere visualizzati sia in forma tabellare che grafica.

Fig 1: distribuzione dei ceppi testati all'interno dei quozienti/distribution of strain among quotient results

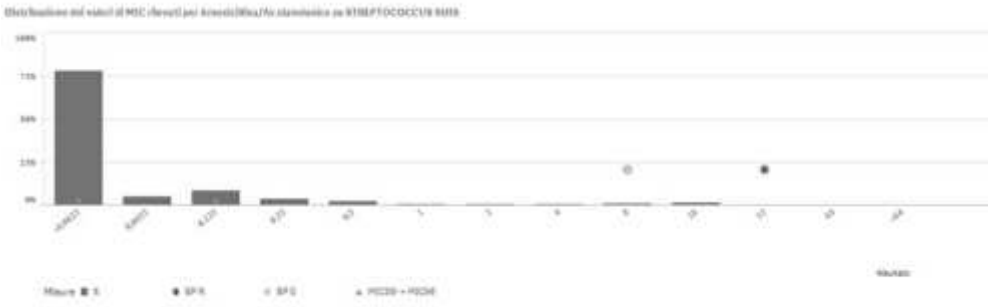


Fig 2: distribuzione dei ceppi testati per valore di MIC ottenuto/distribution of strains among MIC results

RISULTATI

Nei primi 24 mesi di utilizzo della metodica MIC, ovvero tra gennaio 2017 e dicembre 2018, sono stati analizzati nei laboratori di diagnostica dell'IZSVe più di 13.700 ceppi batterici isolati nell'attività di routine effettuata su campioni provenienti da differenti specie zootecniche, in particolare dai settori bovino, suino, cunicolo e avicolo, e da compagnia. Di queste più di 700 sono state eseguite da campioni di suini provenienti da oltre 160 diversi allevamenti. I batteri più rappresentati per il suino sono stati *Escherichia coli* e *Streptococcus suis* seguiti da *Pasteurella multocida* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. I dati ottenuti relativamente alla sensibilità agli antimicrobici per queste specie batteriche sono riassunte in tabella 1 e 2, con particolare attenzione, in tabella 2, per i Critically Important Antimicrobials (CIA).

		Quoziente Breakpoint/MIC										
Specie batterica	Antibiotico	1	2	4	8	16	32	64	128	n° campioni	S	%S
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Amoxicillina/Ac clavulanico	0	0	1	4	14	21	4	5	50	49	98,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	3	13	11	8	10	3	0	0	50	48	96,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Florfenicolo	1	2	11	29	0	0	0	0	50	43	86,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Ampicillina	2	6	13	6	3	0	0	0	50	30	60,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Tetraciclina	17	3	2	0	0	0	0	0	50	22	44,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Spectinomicina	0	1	0	0	0	0	0	0	50	1	2,00%
ESCHERICHIA COLI	Apramicina	9	28	126	85	10	1	0	0	313	259	82,75%
ESCHERICHIA COLI	Aminosidina	8	37	120	81	5	0	0	0	312	251	80,45%
ESCHERICHIA COLI	Gentamicina	10	2	26	73	81	3	0	0	313	195	62,30%
ESCHERICHIA COLI	Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	0	8	4	19	21	68	0	0	313	120	38,34%
ESCHERICHIA COLI	Florfenicolo	66	12	1	0	0	0	0	0	313	79	25,24%
ESCHERICHIA COLI	Ampicillina	1	17	19	11	1	0	0	0	312	49	15,71%
ESCHERICHIA COLI	Tetraciclina	2	17	20	3	3	0	0	1	313	46	14,70%
PASTEURELLA SPP.	Amoxicillina/Ac clavulanico	1	0	0	2	1	8	45	37	95	94	98,95%
PASTEURELLA SPP.	Florfenicolo	2	7	72	11	0	1	0	0	96	93	96,88%
PASTEURELLA SPP.	Ampicillina	1	5	43	30	3	7	0	0	95	89	93,68%
PASTEURELLA SPP.	Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	3	10	11	21	12	4	0	0	96	61	63,54%
PASTEURELLA SPP.	Tetraciclina	28	13	0	1	2	0	0	0	95	44	46,32%
PASTEURELLA SPP.	Spectinomicina	9	2	0	0	0	0	0	0	96	11	11,46%
STREPTOCOCCUS SUIS	Amoxicillina/Ac clavulanico	2	1	1	1	5	9	19	193	234	231	98,72%
STREPTOCOCCUS SUIS	Ampicillina	8	15	14	12	24	152	0	0	234	225	96,15%
STREPTOCOCCUS SUIS	Florfenicolo	110	87	9	1	0	0	0	0	234	207	88,46%
STREPTOCOCCUS SUIS	Trimethoprim/Sulfamethoxazolo	14	27	54	40	31	9	0	0	234	175	74,79%
STREPTOCOCCUS SUIS	Spectinomicina	91	43	13	2	1	0	0	0	234	150	64,10%
STREPTOCOCCUS SUIS	Tetraciclina	4	2	1	0	0	0	0	0	234	7	2,99%

Tabella 1: numero e percentuale di ceppi batterici per la specie suina sensibili agli antimicrobici testati sul totale dei campioni testati/number and percentage of bacterial strains isolated from swines sensitive to tested antibiotics on total of tested samples

		Quoziente Breakpoint/MIC										
Specie batterica	Antibiotico - CIA	1	2	4	8	16	32	64	128	n° campioni	S	%S
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Ceftiofur	0	0	1	2	0	3	10	33	50	49	98,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Enrofloxacina	7	1	19	16	2	0	0	0	50	45	90,00%
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE	Tilmicosina	28	5	1	1	0	1	0	0	50	36	72,00%
ESCHERICHIA COLI	Colistina	20	73	117	71	4	0	0	0	313	285	91,05%
ESCHERICHIA COLI	Enrofloxacina	44	18	16	49	72	0	0	0	313	199	63,58%
ESCHERICHIA COLI	Flumequina	39	14	17	86	26	0	0	0	313	182	58,15%
PASTEURELLA SPP.	Ceftiofur	1	2	1	9	12	7	6	57	96	95	98,96%
PASTEURELLA SPP.	Enrofloxacina	4	3	6	5	73	0	0	0	96	91	94,79%
PASTEURELLA SPP.	Tilmicosina	19	24	29	5	0	1	1	2	96	81	84,38%
STREPTOCOCCUS SUIS	Ceftiofur	2	9	24	25	43	72	37	14	234	226	96,58%
STREPTOCOCCUS SUIS	Enrofloxacina	41	133	41	6	0	0	0	0	234	221	94,44%
STREPTOCOCCUS SUIS	Tilmicosina	24	21	1	3	1	1	1	0	234	52	22,22%

Tabella 2: numero e percentuale di ceppi batterici per la specie suina sensibili agli antimicrobici CIA testati sul totale dei campioni testati/number and percentage of bacterial strains sensitive to tested CIA on total of tested samples

DISCUSSIONE

Per quanto concerne i CIA testati, i dati raccolti ed elaborati ad oggi dal cruscotto di reportistica interno hanno permesso di rilevare un'elevata diffusione di sensibilità agli antibiotici dei ceppi di A*ctinobacilus pleuropneumoniae*, *Pasteurella* spp., *Streptococcus suis* per Cefalosporine di

IV generazione (Ceftiofur) e fluorochinoloni (Enrofloxacina) (più del 90% di ceppi sensibili). Per la Tilmicosina si evidenzia invece scarsa efficacia nei ceppi di *S. suis* (22% di ceppi sensibili). I ceppi di *E. coli* si mostrano per la maggior parte sensibili alla Colistina, circa il 90% dei ceppi testati, maggiore attenzione andrebbe posta invece nell'utilizzo di antibiotici appartenenti alle classi dei chinoloni e fluorichinoloni dove risultano sensibili rispettivamente il 58% e il 64% dei ceppi testati.

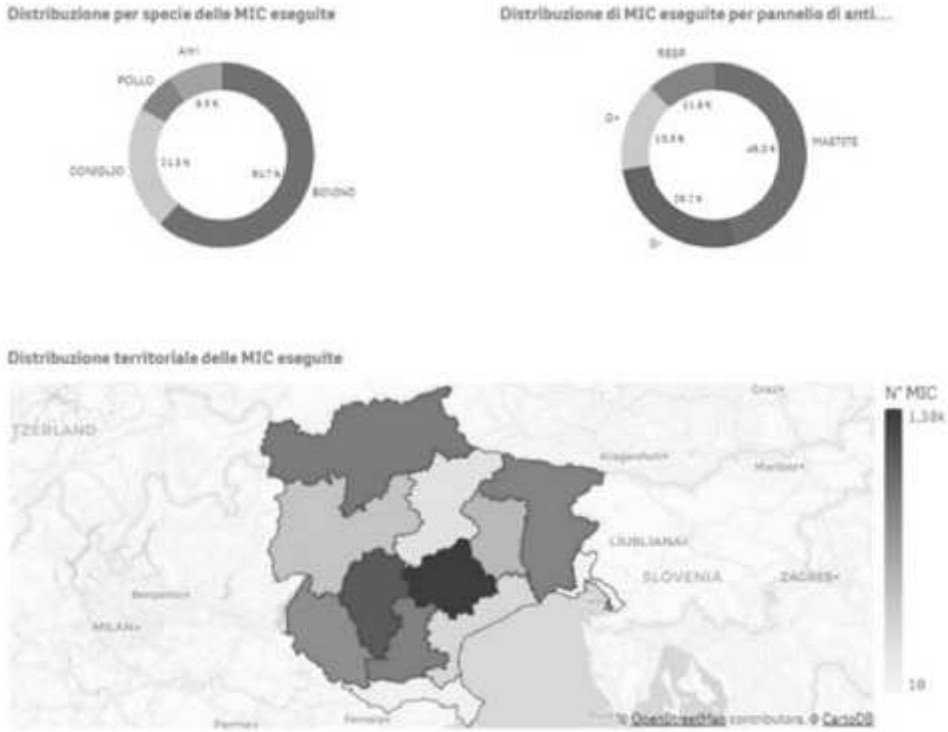
Per i restanti antibiotici presenti nei pannelli MIC, per *A. pleuropneumoniae*, *Pasteurella* spp., *S. suis* si osserva che la maggior parte dei ceppi mostra sensibilità agli antimicrobici soprattutto per l'associazione Amoxicillina/Acido Clavulanico e Florfenicolo (>85%). Sono invece molto frequenti ceppi resistenti per Tetracicline e Spectinomicina.

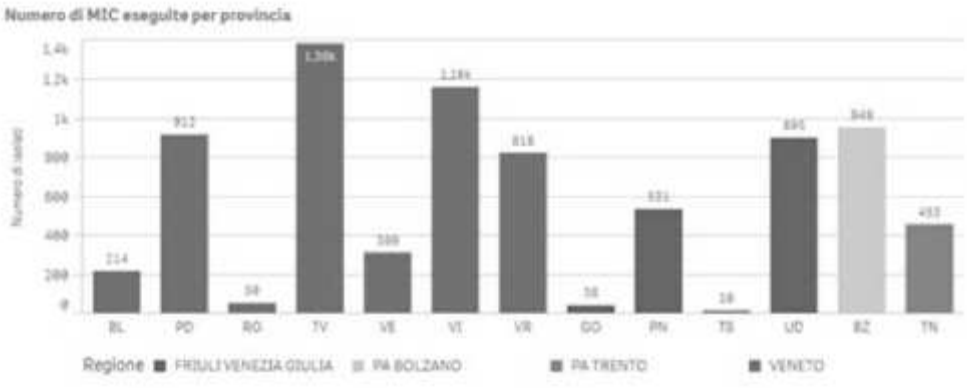
Maggiore attenzione andrebbe posta nei confronti di *E. coli*, per cui si osserva in percentuale una elevata diffusione di ceppi resistenti per Thrimethoprim/Sulfametoxazolo (>60%), Florfenicolo (75%), Penicilline (Ampicillina) (85%) e Tetracicline (85%).

CONCLUSIONI

La possibilità di accedere rapidamente ad un sistema di archiviazione, consultazione e gestione dei risultati delle analisi con metodica MIC dei casi clinici relativi agli allevamenti seguiti, ha lo scopo di facilitare il collega libero professionista nella scelta del più corretto protocollo terapeutico e permette di verificare rapidamente variazioni dell'antibiotico sensibilità nel tempo contribuendo quindi al contenimento dello sviluppo di fenomeni di antibiotico resistenza. Il dato storico di MIC può essere utilizzato anche, tramite il monitoraggio periodico, per costruire uno storico di allevamento che faciliti la scelta di una terapia adeguata i primi sintomi di malattia.

Sul sito web dell'IZSVe (https://www.izsvenezie.it/temi/altri-temi/antibiotico-resistenza-sensibilita/report-pubblico/) è inoltre disponibile un report generale costruito sulla base dei dati





finora ottenuti, interamente navigabile e basato sulla tecnologia Qlik Sense ®.
Fig 3: IZSVe MIC Report pubblico/IZSVe and MIC public report

BIBLIOGRAFIA

1. Barton M. D. Impact of antibiotic use in the swine industry https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.05.017
2. CLSI M11-A8 (2012). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; approved standards - Eight edition;
3. CLSI VET 01-A4. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standards - Fourth edition;
4. CLSI VET 01-S2. (2013). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Second informational supplement;
5. CLSI VET 01-S3. (2015). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals - Second informational supplement;
6. CLSI M100-S24. (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty fourth informational supplement;
7. CLSI VET-06 (2017). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria Isolated from animals

MONITORAGGIO DEL CONSUMO DI ANTIMICROBICI NEGLI ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA NEL PERIODO 2016-2017: DATI PRELIMINARI

MONITORING ANTIMICROBIAL USE IN EMILIA ROMAGNA REGION HERDS DURING 2016-2017: PRELIMINARY RESULTS

PANGALLO G.[1], BASSI P.[1], MOTTA V.[2], SALVARANI C.[2], LUPPI A.[1], MERIALDI G.[1], SCALI F.[1], ALBORALI G.L.[1], BOSI P.[2], TREVISI P.[2]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia and Emilia-Romagna;
[2]Dip. Scienze e Tecnologie Agroalimentari (DISTAL), Università degli studi di Bologna, Bologna, Italy

Parole chiave: antimicrobico-resistenza, consumo antimicrobici
Key words: antimicrobial-resistance, antimicrobial use

RIASSUNTO

L'uso prudente degli antimicrobici nell'allevamento intensivo è un punto chiave per contrastare l›insorgere dei fenomeni di antimicrobico-resistenza. I risultati riportati in questo studio sono stati ottenuti dalle indagini condotte in un progetto della regione Emilia-Romagna volto a quantificare l'uso di farmaci antimicrobici in un campione di 30 allevamenti di suini, mettendo a confronto gli anni 2016 e 2017.
I dati relativi al consumo di antimicrobici sono stati elaborati per il calcolo delle *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit). Il progetto ha previsto un percorso di riduzione del consumo del farmaco antimicrobico attraverso l'attività di formazione, l'assistenza nella scelta degli antimicrobici e l'implementazione del benessere, biosicurezza e dell'attività diagnostica nelle aziende partecipanti. Dal confronto dei dati raccolti nei due periodi considerati, si registra una riduzione dell'uso complessivo di antimicrobici (-22,1%) e degli HPCIAs (*highest priority critically important antimicrobials*) (-47,3%). Nella categoria svezzati è stata osservata una riduzione del 53,46% del consumo di antimicrobici totali e dell'88,9% degli HPCIA. Un'importante riduzione è stata osservata anche nelle scrofe (-21,25% di antimicrobici totali e -62,89% HPCIA) e nei suini nella fase d'ingrasso (-16,33% di antimicrobici totali e -45,84% di HPCIA). Al contrario, un lieve aumento è stato riscontrato nei suinetti sottoscrofa (+2,49% di antimicrobici totali e +8,39% di HPCIA).

ABSTRACT

The prudent use and the reduction of antimicrobials usage (AMU) in food producing animals is a key point to counteract the emergence of antimicrobial-resistance. The results reported in this study were obtained from a survey conducted in a project of the Emilia-Romagna region aimed at quantifying AMU in a sample of 30 pig farms and comparing the results obtained for the years 2016 and 2017. The project has also concerned, through a training course for veterinarians and breeders, the implementation of welfare and biosecurity levels as a tool for reducing AMU. The data collected were processed for the calculation of the Defined Daily Dose Animal for Italy (DDDAit). Comparing the results obtained in the two periods considered, there is a reduction in overall AMU (-22.1%) and HPCIAs (highest priority critically important antimicrobials) usage (-47.3%). Considering the different production categories included in the study,

in pigs during the weaning period a reduction of 53.6% of total AMU and of 88.9% of HPCIAs was observed. An important reduction was also observed in sows (-21.25% overall AMU, -62.89% HPCIAs) and in finishers (-16.33% of overall AMU, -45.84% of HPCIAs). In contrast, a slight increase was found in suckling piglets (+2.49% of overall AMU, +8.39% of HPCIAs).

INTRODUZIONE

L'utilizzo degli antimicrobici in allevamento comporta inevitabilmente l'instaurarsi di una pressione selettiva in grado di favorire la selezione e la diffusione di batteri resistenti e tale rischio aumenta a fronte di un uso irrazionale, spesso volto a sopperire a carenze gestionali e strutturali. La filiera suina rappresenta uno dei punti critici per l'insorgenza delle resistenze, questo soprattutto a causa di una gestione degli antimicrobici non sempre appropriato. Le principali criticità sono riconducibili a: scarso ricorso ad esami di laboratorio e limiti del percorso diagnostico; trattamenti di massa; somministrazione di antimicrobici per via orale; uso degli antimicrobici a scopo profilattico o metafilattico; utilizzo frequente e non giustificato di alcune classi d'antimicrobici considerate d'Importanza Critica per l'uomo (Critically important antimicrobials, CIAs).

Al fine di contenere l'antimicrobico-resistenza (AMR), il mondo scientifico è concorde nel sostenere che gli antimicrobici dovrebbero essere utilizzati esclusivamente a scopo terapeutico, a seguito di specifica diagnosi e che i trattamenti di massa a scopo metafilattico e soprattutto a scopo profilattico dovrebbero essere evitati o fortemente limitati.

La prevenzione delle malattie, attraverso l'applicazione di misure di biosicurezza, una migliore gestione degli allevamenti, il rispetto dei parametri di benessere ed il ricorso ad esami di laboratorio, diventano quindi fondamentali per la corretta gestione dell'antimicrobico nell'allevamento suinicolo e risultano indispensabili per prevenire o limitare l'insorgenza e la diffusione di batteri resistenti.

Questo problema deve essere affrontato secondo un approccio che coinvolga necessariamente i diversi "attori della filiera" (medico veterinario "prescrittore", medico veterinario pubblico, rete dei laboratori, allevatori e tecnici coinvolti nella gestione dell'allevamento), attivando piani di monitoraggio sul consumo di antimicrobici e sullo sviluppo di resistenze.

L'acquisizione di informazioni quantitative sulle prescrizioni degli antimicrobici nei singoli allevamenti è uno strumento indispensabile per il monitoraggio dei consumi e l'adozione di indici condivisi e standardizzati a livello di Comunità Europea, come ad esempio la "dose definita giornaliera" (es. Defined Daily Dose, DDD), permette di valutare i consumi di ciascun principio attivo (PA),in maniera uniforme rendendoli paragonabili nel tempo e tra diverse realtà produttive sia nazionali che internazionali.

L'armonizzazione dei dati potrà fornire utili indicazioni sulle decisioni da intraprendere per l'uso razionale di tutte le classi di antimicrobici, con particolare attenzione ai CIAs, in particolare quelli di massima priorità (*highest priority critically important antimicrobials* HPCIAs) (WHO 2017), quali cefalosporine III e IV generazione, chinoloni, macrolidi e colistina, che andrebbero utilizzati in maniera limitata e/o solo in casi eccezionali, su specifica diagnosi ed in assenza di valide alternative terapeutiche dimostrate da test di sensibilità agli antimicrobici sugli agenti eziologici della malattia batterica diagnosticata.

Secondo gli ultimi aggiornamenti disponibili pubblicati dall'EMA attraverso il report ESVAC 2018 l'Italia, insieme a Spagna e Cipro, è tra i maggiori consumatori di antimicrobico in Europa. La preoccupazione per il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza in batteri isolati da animali ha portato i vari Stati europei a rivedere le politiche

sanitarie mettendo in atto azioni volte a ridurre l'uso degli antimicrobici, soprattutto in ambito zootecnico.

Scopo del presente lavoro è quello di riportare i dati preliminari ottenuti dallo sviluppo di un progetto proposto dalla Regione Emilia Romagna volto a quantificare l'uso di antimicrobico in un campione di aziende suinicole, con lo scopo di una sua riduzione (≥20%) nel triennio 2016-2019 attraverso un percorso di formazione di medici veterinari ed allevatori e l'implementazione dei livelli di benessere e biosicurezza aziendale (PSR 2014-2020 – misura 16.1.01 - F2A, Regione Emilia Romagna).

MATERIALI E METODI

Nel presente progetto sono state coinvolte 30 aziende suinicole con le seguenti caratteristiche produttive: 2 siti 1, 4 siti 1-2, 3 allevamenti a ciclo chiuso, 1 sito 2 e 20 siti 3 (tabella 1). Ogni azienda è stata visitata nel 2017 e 2018 per la raccolta dei dati relativi al consumo di antimicrobico rispettivamente per gli anni 2016 e 2017, basandosi sulle evidenze riportate nei registri aziendali. Inoltre sono state verificate le categorie di animali per le quali il farmaco veniva utilizzato, i parametri zootecnici (produttivi e riproduttivi) ed il numero di animali potenzialmente a rischio di essere trattati (tabella 1). I dati grezzi sono stati riorganizzati e inviati alla sede IZSLER di Brescia per l'elaborazione. I dati grezzi sono stati inseriti in un apposito database XML, utilizzando un software HTML5 e il calcolo del consumo di antimicrobici è stato eseguito secondo indicatori standardizzati, le DDDAit (*Defined Daily Dose Animal for Italy*), sviluppati durante la fase di validazione del sistema ministeriale ClassyFarm. Una DDDAit rappresenta la dose, in milligrammi di PA, utilizzata per tenere sotto trattamento un chilogrammo di peso vivo nell'arco di ventiquattro ore. Tale dosaggio non è tuttavia quello realmente somministrato a ciascun animale trattato, bensì, quello definito dal riassunto delle caratteristiche del prodotto (dose standardizzata). Il consumo di antimicrobici è stato calcolato secondo la seguente formula generale:

$$\sum_{i=1}^{n} \frac{PA_i \text{ consumato (mg)}}{DDDAit_i \text{ (mg/kg PV DIE)} \times \text{animali (n)} \times \text{peso standard (kg)}}$$

I calcoli di consumo sono stati eseguiti separatamente per ciascuna categoria d'età (scrofe, suinetti sottoscrofa, svezzati, grassi). Il peso standard al trattamento per le scrofe è stato fissato a 240 kg, per i suinetti sottoscrofa a 4 kg, per gli svezzati a 12 kg e per i grassi a 100 kg.

Tabella 1: Tipologia e dati consistenza aziendale nel 2016.
Table 1: Characteristic and data about farm consistency in 2016.

TIPOLOGIA AZIENDALE	N. SCROFE	N. SUINETTI	N. SVEZZATI	N. GRASSI
1. Ciclo chiuso	757	17886	16007	1500
2. Ciclo chiuso	824	23370	19383	5000
3. Ciclo chiuso	302	3930	1800	1656
4. Sito 1	1783	58452		
5. Sito 1	290	8066		
6. Sito 1-2	1196	32764	7816	
7. Sito 1-2	281	10002	7988	
8. Sito 1-2	541	14844	12444	
9. Sito 1-2	290	8066	7840	
10. Sito 2			15783	
11. Sito 3			7496	11847
12. Sito 3				6154
13. Sito 3				23455
14. Sito 3				5282
15. Sito 3				3892
16. Sito 3			7176	4395
17. Sito 3				12617
18. Sito 3				7202
19. Sito 3				8570
20. Sito 3				3323
21. Sito 3				3151
22. Sito 3				1500
23. Sito 3				2500
24. Sito 3				4766
25. Sito 3				1615
26. Sito 3				2819
27. Sito 3				2610
28. Sito 3				350
29. Sito 3				23741
30. Sito 3				3975

I dati relativi al consumo del farmaco, raccolti durante la prima visita, sono stati impiegati per la produzione di un report specifico per ogni singola azienda in cui sono state evidenziate le principali criticità relative all'uso dell' antimicrobico ed attraverso il quale è stato avviato un percorso di riduzione del consumo totale degli antimicrobici e, soprattutto, degli

HPCIAs. Questo si è basato principalmente su attività di formazione e di assistenza nella scelta delle molecole antibiotiche, prendendo in considerazione i principi dell'uso prudente dell'antimicrobico e, allo stesso tempo, promuovendo l'attività diagnostica nelle aziende coinvolte nel progetto. Infine, i dati ottenuti per i consumi nei due periodi considerati sono stati confrontati per evidenziare eventuali differenze.

RISULTATI

Dai rilevamenti effettuati, nel periodo 2017, rispetto al 2016, si evidenzia una riduzione complessiva nell'uso dell'antimicrobico pari al 22,1% e degli HPCIAs del 47,3%.
Per quanto riguarda il consumo totale, la riduzione maggiore è stata registrata nella categoria degli svezzati con un calo del 53,46% (103,98 DDDAit nel 2016 vs 48,39 DDDAit nel 2017), seguita dalle scrofe con una riduzione del 21,25% (19,11 DDDAit nel 2016 vs 15,05 DDDAit nel 2017). Nei grassi il consumo di antimicrobico ha evidenziato una diminuzione del 16,33% (22,59 DDDAit nel 2016 vs 18,9 nel 2017), mentre nei suinetti sottoscrofa è stato registrato un aumento del 2,49% (25,99 DDDAit nel 2016 vs 26,65 DDDAit nel 2017) (tabella 2).

Tabella 2: differenze delle DDDAit per ogni categoria produttiva negli anni 2016 e 2017.
Table 2: DDDAit differences by pig categories in the years 2016 and 2017.

DDDAit Scrofe			DDDAit Suinetti			DDDAit Svezzati			DDDAit Grassi		
2016	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**
19,11	15,05	-21,25%	25,99	26,65	2,49%	103,98	48,39	-53,46%	22,59	18,90	-16,33%

Per quanto riguarda gli HPCIAs è stata registrata una riduzione dell'88,9% per gli svezzati, del 62,89% per le scrofe e del 45,84% per i grassi, mentre è stato rilevato un aumento dell'8,39% nei suinetti sottoscrofa (tabella 3).

Tabella 3: differenze delle DDDAit per gli HPCIAs nelle diverse categorie produttive per gli anni 2016 e 2017.
Table 3: HPCIAs DDDAit differences in the pig categories in the years 2016 and 2017.

CLASSE	DDDAit SCROFE			DDDAit SUINETTI			DDDAit SVEZZATI			DDDAit GRASSI		
	2016	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**	**2016**	**2017**	**Δ**
Cefalosporine III e IV gen.	0	0	-	11,20	11,44	2,13%	0,14	0,10	-27,26%	0,05	0,02	-54,94%
Fluorochinoloni	0,71	0,64	-9,99%	1,20	1,48	18,89%	0,61	0,39	-35,32%	0,15	0,19	21,61%
Macrolidi	1,31	0,10	-92,26%	5,07	8,19	38,11%	5,26	2,50	-52,51%	2,40	1,67	-30,69%
Colistina	0,00	0,01	-	1,88	0,01	-99,61%	21,11	0,02	-99,92%	1,15	0,16	-86,51%
Totale	2,02	0,75	-62,89%	19,34	21,11	8,39%	27,12	3,01	-88,90%	3,75	2,03	-45,84%

Tra gli HPCIA, il dato più rilevante è rappresentato dalla forte riduzione dell'uso di colistina, con una diminuzione media del 95,3% tra i due periodi considerati, considerando le categorie dei suinetti, svezzati e grassi. Entrando nello specifico, appare importante sottolineare la notevole riduzione riscontrata per la categoria degli svezzati (-99,92%) nella quale l'uso della colistina ha sempre costituito la parte preponderante del suo utilizzo in suinicoltura.

Tra le altre molecole antibiotiche si registra una diminuzione nell'uso di macrolidi (-92,26%) e fluorochinoloni (-9,99%) per le scrofe. Negli svezzati si riporta una riduzione nell'uso di macrolidi (-52,51%), fluorochinoloni (-35,32%) e delle cefalosporine di III-IV generazione (-27,26%), così come per i grassi dove questa ha interessato le cefalosporine di III-IV generazione (-54,94%) e i macrolidi (-30,69%) mentre per i fluorochinoloni il dato appare in aumento (+21,61%). Per i suinetti sottoscrofa, al contrario, è stato registrato un aumento nell'uso di macrolidi (+38,11%), dei fluorochinoloni (+18,89%) e delle cefalosporine di III-IV generazione (+2,13%).
Infine, le molecole antimicrobiche mediamente più utilizzate nei due periodi in esame sono risultate essere l'amoxicillina e la doxiciclina per le scrofe, il ceftiofur e l'amoxicillina per i suinetti sottoscrofa, l'amoxicillina e la tiamulina per gli svezzati, la lincomicina e le formulazioni a base di trimethoprim + sulfamidici per i grassi.
Per quanto riguarda la via di somministrazione, è stata registrata una diminuzione dell'uso di premiscele a favore della polvere orale (43,1% vs 46,2%) negli svezzati, mentre per le altre categorie, in proporzione non sono state registrate variazioni significative nel 2017 rispetto al 2016. Nei grassi la premiscela rimane la via di somministrazione più utilizzata (50,2%), mentre la polvere orale rimane la più frequente nelle scrofe (73,9%). La somministrazione per via parenterale è ovviamente quella maggiormente praticata nei suinetti lattanti (93,3%) (figura 1).

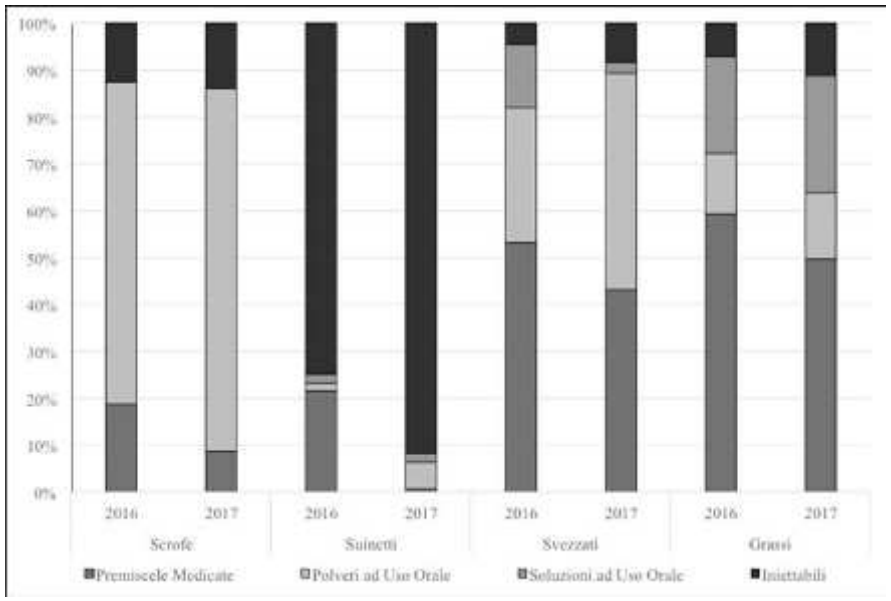


Figura 1: via di somministrazione degli antimicrobici nel biennio 2016-2017.
Figure 1: route of antimicrobial administration in the two-year period 2016-2017.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

I risultati preliminari del progetto pilota riportati nel presente lavoro mostrano, per il campione di aziende incluse nello studio, una riduzione media del 22,1% nell'uso di antimicrobico e del 47,3% per quanto riguarda i CIAs tra i due periodi temporali messi a confronto. Tale riduzione è risultata essere maggiormente apprezzabile, in ordine, per la categoria degli svezzati (-53,46%), seguita dalle scrofe (-21,25%) e dai grassi (-16,33%), mentre è stato

osservato un lieve aumento per il consumo nei suinetti (2,49%).
In generale la diminuzione del consumo di antimicrobico osservata è attribuibile a diversi fattori tra cui l'attività di informazione e formazione di allevatori e veterinari coinvolti nel progetto, con i quali è stato intrapreso un percorso caratterizzato dalla valutazione delle criticità aziendali in termini di uso del farmaco antimicrobico, studio di possibili misure di riduzione, unitamente all'analisi delle problematiche sanitarie aziendali. A questo si deve aggiungere l'attività di valutazione dei punti critici aziendali relativi al benessere e alla biosicurezza condotta nel corso del progetto, che ha fornito spunti di miglioramento da applicare nelle aziende coinvolte. Infine, la crescente consapevolezza degli addetti ai lavori nei confronti di una problematica divenuta progressivamente oggetto di controllo da parte dell'Autorità Sanitaria, ha giocato un ruolo fondamentale nel predisporre condizioni ideali per il raggiungimento degli obiettivi prefissati.
In particolare, la riduzione osservata per la categoria degli svezzati, tra i due periodi considerati, è largamente influenzata dal dato relativo alla colistina (-99,92% tra i due periodi in esame). Questo dato è sostanzialmente da attribuire alla recente storia che ha interessato questa molecola, per la quale si è reso necessario un cambio di rotta rispetto al passato. La colistina era largamente impiegata in suinicoltura per la terapia, metafilassi e profilassi delle forme gastroenteriche sostenute da *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. La rinnovata importanza della colistina come farmaco salvavita in medicina umana per la terapia delle infezioni da enterobatteri multiresistenti e la scoperta in alcuni di questi ceppi batterici, del gene plasmidico MCR-1 codificante per la resistenza alla colistina, hanno portato il mondo scientifico e politico a rivedere l'opportunità di utilizzo di questo antimicrobico in zootecnia. A questo proposito la decisione della Commissione Europea nel luglio 2016 (a seguito del parere EMA sull'argomento), il DMS n. 117/2016 e la nota del Ministero della Salute del 05/08/2016 (n° 18992), hanno posto importanti limitazioni all'utilizzo della colistina, inquadrandola, di fatto, come molecola d'importanza critica. L'uso responsabile della colistina prevede il suo impiego unicamente come ultima risorsa, qualora nessun efficace trattamento alternativo sia disponibile e sulla base di test di sensibilità.
L'assenza di riduzione descritta per i suinetti sottoscrofa è legata principalmente a trattamenti di routine sia profilattici sia metafilattici che questi ricevono in corrispondenza della castrazione e del taglio della coda nella prima settimana di vita e, frequentemente, anche al momento dello svezzamento. Tali approcci terapeutici vedono non di rado l'impiego di HPCIAs ed in particolare del ceftiofur, nella maggior parte dei casi per la prevenzione di forme cliniche legate ad infezione da *Streptococcus* spp. A questo proposito si ritiene non adeguato l'impiego di un antimicrobico d'importanza critica come il ceftiofur con queste modalità, essendo presenti valide alternative ad esempio tra gli altri antimicrobici β-lattamici.
Per quanto riguarda le molecole più utilizzate nel biennio in esame, l'amoxicillina ricopre un ruolo molto importante soprattutto per la categoria degli svezzati e dei suinetti sottoscrofa, per il controllo di forme morbose sostenute da *Streptococcus spp.* Nei grassi, invece, le molecole più utilizzate sono la lincomicina, i sulfamidici+trimethoprim e l'amoxicillina, impiegati per il trattamento, rispettivamente, di forme enteriche (soprattutto sostenute da *B. hyodisenteriae*) e respiratorie (da *P. multocida* e *A. pleuropneumoniae*) tipiche di questa fase di allevamento.
La via di somministrazione orale attraverso l'acqua di bevanda o il mangime, è risultata essere la più comune in tutti gli allevamenti inclusi nello studio. Il dato ottenuto è risultato essere in linea con la maggior parte dei Paesi europei (dati EMA, 2018) e questo in virtù del fatto che la terapia di massa presenta alcuni vantaggi di tipo gestionale e permette un approccio metafilattico e profilattico, che tuttavia non è in linea con i principi di uso prudente dell'antimicrobico.
In Italia, come si evince dai dati ESVAC, il trend del consumo di antimicrobici in zootecnia appare in diminuzione come osservato per la maggior parte dei Paesi europei (report ESVAC, 2018). I risultati ottenuti nel presente studio hanno evidenziato come la promozione di

formazione (seminari, incontri, convegni), l'attività di consulenza alle aziende, avvalendosi anche delle evidenze riscontrate in sede diagnostica (esami di laboratorio, test di sensibilità antimicrobica) e l'identificazione dei punti critici in materia di benessere e di biosicurezza aziendale possono costituire un valido strumento per la riduzione dei consumi del farmaco antimicrobico. Principi, questi, contenuti nel Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico Resistenza (PNCAR 2017-2020), in vigore dal 2017 che si pone come obiettivo la diminuzione del consumo di antimicrobici e, in particolare: riduzione del 30% di antimicrobici in ambito veterinario, riduzione del 30% di antimicrobici in formulazioni farmaceutiche per via orale (premiscele, polveri e soluzioni orali) e la riduzione del 10% di HPCIAs. Gli obiettivi di riduzione sopraccitati riguardanti il settore veterinario verranno valutati nel 2020 rispetto al dato del 2016. Gli strumenti per il raggiungimento degli obiettivi riportati nel piano sono l'introduzione della ricettazione elettronica, la classificazione delle aziende sulla base del rischio di sviluppo di antimicrobico-resistenza (AMR), la predisposizione di linee guida per l'uso prudente di antimicrobici in animali produttori di alimenti e animali da compagnia, il rafforzamento del sistema di sorveglianza e monitoraggio dell'AMR e la promozione di programmi di comunicazione, formazione e informazione.
Infine, la raccolta dei dati relativi al consumo dell'antimicrobico nel 2018 è tutt'ora in corso e l'elaborazione finale di queste informazioni, unitamente alla valutazione dei dati relativi al livello di benessere e di biosicurezza, potranno fornire indicazioni sulle possibili correlazioni tra questi aspetti gestionali e il consumo del farmaco antimicrobico, come già dimostrato da altri Autori (Gelaude et al. 2014; Postma et al. 2017).

RINGRAZIAMENTI
I dati presentati sono stati raccolti nell'ambito del progetto n. 5005479 (2016-2019) finanziato nell'ambito del PSR 2014-2020 – misura 16.1.01 - F2A, della Regione Emilia Romagna. Si ringraziano i Colleghi Veterinari e gli Allevatori che attraverso la loro attività e collaborazione hanno permesso la realizzazione del progetto.

BIBLIOGRAFIA
1. Brogan D.M. and Mossialos E. (2016). A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. Global Health 12: 8.
2. European Medicines Agency (EMA). (2018). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016: trends from 2010 to 2016. Eighth ESVAC report.
3. European Medicines Agency (EMA). (2014). Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.
4. Gelaude P., Schlepers M., Verlinden M., Laanen M., Dewulf J. (2016). Biocheck.UGent: A quantitative tool to measure biosecurity at broiler farms and the relationship with technical performances and antimicrobial use. Poultry Science 93 :2740–2751.
5. Ministero della Salute. Decreto 25 luglio 2016 n°117. Gazzetta Ufficiale n.197 del 24/8/2016. www.gazzettaufficiale.it/eli/id/2016/08/24/16A06233/sg;
6. Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico Resistenza (PNCAR). Ministero della Salute, Italia. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf
7. Postma M, Vanderhaeghen W, Sarrazin S, Maes D, Dewulf J. Reducing Antimicrobial Usage in Pig Production without Jeopardizing Production Parameters. Zoonoses Public Health. **64**; (1):63-74.
8. World Health Organization (WHO). (2017). Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 5th rev. ISBN 978-92-4-151222-0.

STUDIO SULL'USO DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI PER LA DIAGNOSI DI PRRS IN CONDIZIONI DI CAMPO

STUDY ON USE OF PROCESSING FLUIDS FOR PRRS DIAGNOSIS IN FIELD CONDITIONS

USTULIN M.[1], TONON F[2], LOMBARDO F.[2], GIORGIUTTI M:[3], TARGHETTA C.[1], TOFFOLETTO M.[1], VIO D.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)
[2] Suivet s.n.c, Via Martiri della Bettola, 67/8, 42123 Reggio Emilia, Italy
[3] Libero professionista, Pagnacco (UD)

Parole chiave: siero di sangue, emosieri testicolari, PRRS
Keywords: blood serum, processing fluids, PRRS

RIASSUNTO
La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) rappresenta ancora oggi una causa di gravi perdite economiche negli allevamenti suinicoli e in particolar modo negli allevamenti da riproduzione. Attualmente la verifica della circolazione di PRRSV su animali in vita è basata prevalentemente sulla ricerca del genoma del virus da campioni di siero di sangue e di fluidi orali. Vi è però interesse nella valutazione di matrici alternative che permettano di limitare stress e manipolazioni soprattutto in animali molto giovani. Una delle matrici che sta destando interesse è l'emosiero testicolare, ovvero il liquido siero-ematico derivante dai testicoli raccolti al momento della castrazione. Nel presente studio il confronto tra questa matrice e il siero di sangue ha mostrato una buona concordanza; l'utilizzo degli emosieri testicolari può tuttavia presentare un maggiore rischio di risultati falsi negativi a seguito di diluizione dovuta all'elevato numero di testicoli da cui deriva il campione da sottoporre ad analisi.

ABSTRACT
Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) causes great economical loss in swine industry, mainly in breeding herds. Analysis to verify PRRS circulation is mainly performed by revealing virus genome on serum samples. The evaluation of sample matrixes that allow to limit animals manipulation, mainly in the youngest piglets, is an important field of interest. One of the new matrixes under evaluation is processing fluids, the liquids extracted from testicles obtained during castration. In the present study the comparison between processing fluids and serum showed a good concordance. Concern lies in the risk of dilution and false negative results from processing fluids duo to pooling of too many litters.

INTRODUZIONE
La Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino (PRRS) è, dalla sua comparsa a oggi, una delle più importanti cause di perdite economiche negli allevamenti suinicoli da riproduzione, in termini di aborti, aumento della mortalità e calo delle performance zootecniche.
L'obiettivo primario per il controllo dei danni causati da questa patologia in un allevamento da riproduzione in cui sia presente il virus della PRRS è quello di stabilizzare la scrofaia, ovvero di implementare strategie di controllo della circolazione virale atte da un lato a ridurre le problematiche legate alla sintomatologia riproduttiva e dall'altro a non svezzare

suinetti viremici nel tentativo di ritardare il più possibile il contatto dei nuovi nati con il virus (Holtkamp et al., 2010). A tal fine è importante mantenere alta l'attenzione nelle prime fasi di vita prevedendo protocolli di campionamento e analisi che permettano di poter verificare precocemente la circolazione di virus della PRRS nei suinetti.
Il protocollo di monitoraggio della PRRS attualmente suggerito a livello internazionale consiste nel prelievo mensile di sangue da 30 suinetti scelti casualmente allo svezzamento analizzati in 6 pool da 5 tramite PCR per la rilevazione del RNA virale; un allevamento da riproduzione viene considerato "stabile" nei confronti della PRRS a seguito di 4 campionamenti mensili risultati negativi. Questo piano di campionamento parte dal presupposto che PRRSV non possa permanere in allevamento con una prevalenza inferiore al 10% per più di 90 giorni e che per definire in modo accurato il reale status aziendale sia necessario testare i suinetti sottoscrofa; non sono infatti rari i casi in cui PRRSV è stato rilevato entro breve periodo dall'acquisizione dello status di stabilità aziendale (Prickett et al., 2010) e altrettanto frequenti possono essere situazioni di prevalenza molto bassa dell'infezione in allevamenti endemicamente infetti. Il prelievo di sangue in suinetti di pochi giorni di vita può essere rischioso e rappresenta un evento stressante per i soggetti sottoposti a tale manipolazione; è quindi utile valutare la possibilità di analizzare matrici alternative per la diagnosi precoce.
Una matrice alternativa al siero di sangue di cui si sta diffondendo l'utilizzo è rappresentata dagli emosieri testicolari (Gillespie T.G,., 2018), ovvero i liquidi tissutali ottenuti dal percolamento dei testicoli dei suinetti raccolti al momento della castrazione. Per garantire l'attendibilità dei risultati delle analisi effettuate su tali nuove matrici è di estrema importanza verificare che vi sia corrispondenza tra i risultati ottenuti su tali campioni e quelli ottenuti sulle matrici più comunemente utilizzate, nello specifico il siero di sangue.
Il presente lavoro rappresenta una un primo confronto della concordanza tra l'uso degli emosieri testicolari e del siero di sangue in condizioni di campo.

MATERIALI E METODI
Il protocollo di campionamento di seguito illustrato è stato applicato in quattro allevamenti da riproduzione selezionati in funzione dello status sanitario nei confronti della PRRS, nello specifico in tre allevamenti erano state rilevate problematiche alla circolazione virale nei suinetti sottoscrofa mentre in un allevamento tale problematica non si rilevava da lungo tempo. Da ciascun allevamento sono state selezionate da cinque a dieci covate con almeno 5 soggetti maschi, le covate sono state scelte in modo da includere scrofe di diverso ordine di parto, comprendendo almeno 3 primipare, al fine di ottenere un campione rappresentativo di tutte le età.
Dai soggetti maschi selezionati in ogni covata è stato effettuato un prelievo di sangue. Dei due testicoli di questi soggetti uno è stato utilizzato per costituire un pool di testicoli formato dai soli soggetti selezionati e uno è stato incluso in un secondo pool costituito dai testicoli di tutte le covate (1 testicolo per soggetto).
Dopo la raccolta tutti i campioni sono stati conservati a temperatura di refrigerazione e conferiti al Laboratorio di Diagnostica Clinica della Sezione di Pordenone entro 24 ore dal prelievo.
I sieri sono stati processati in pool di 5 rispettando la suddivisione per covata, in modo da mimare l'attuale sistema di campionamento.
Tutti i campioni sono stati sottoposti a rilevazione del virus della sindrome respiratoria e riproduttiva del suino (PRRSV). mediante retro-trascrizione e amplificazione dell'acido nucleico con Kit Realtime LSI VetMax™ PRRSV EU/NA Life Technologies™.

L'analisi degli emosieri testicolari derivanti dal pool di 5 testicoli dei soggetti selezionati è stata eseguita allo scopo di verificare la corrispondenza delle due matrici nell'analisi degli stessi individui (pool di sieri contro emosieri testicolari).
Le analisi dei testicoli dei pool di più covate sono state condotte con lo scopo di mettere a confronto non solo le due diverse matrici ma anche i due metodi di campionamento. I risultati ottenuti sono stati confrontati tramite il calcolo della *kappa* di Cohen a valutazione della concordanza tra emosieri testicolari e pool di sieri considerato Gold Standard.

RISULTATI
Come premesso, i campioni previsti dalla studio sono stati prelevati in 4 allevamenti, denominati A, B, C, e D; negli allevamenti A, B, e C era stata rilevata recentemente la circolazione virale nei suinetti sottoscrofa, al contrario tale evenienza non si rilevava da lungo periodo nell'allevamento D.
Nell'allevamento A sono state oggetto di campionamento le nidiate di 5 scrofe; sono risultati contemporaneamente positivi i pool di sieri e i corrispettivi emosieri testicolari dei suinetti di una delle 5 nidiate; in questo allevamento è risultato positivo il pool totale di tutti gli emosieri di tutte le nidiate (25 soggetti).
Nell'allevamento B su 10 nidiate incluse nel campionamento, una nidiata è risultata positiva sia all'analisi del pool di sieri che al pool dei corrispettivi emosieri testicolari; una nidiata è risultata positiva solo all'analisi del pool degli emosieri testicolari mentre il pool costituito dagli emosieri testicolari delle 10 nidiate (50 soggetti) è risultato negativo.
Nell'allevamento C, 2 dei 10 pool di sieri sono risultati positivi mentre non sono state rilevate positività a carico degli emosieri corrispondenti; anche il pool di emosieri testicolari comprendente le 10 nidiate (50 soggetti) è risultato negativo. Tenuto conto della difformità dei risultati ottenuti e in ragione della vaccinazione con virus vivo attenuato dei suinetti oggetto di studio avvenuta 4-5 ore prima, si è proceduto a sequenziare ORF 5 e ORF 7 del virus identificato; il confronto delle sequenze di ORF 5 e ORF 7 con le sequenze vaccinali corrispondenti ha permesso di evidenziare che il virus identificato corrispondesse con il virus vaccinale.
Nell'allevamento D, nel quale non si rilevava da tempo circolazione di PRRSV nei suinetti sottoscrofa, sono state campionate 7 nidiate; in quest'ultima azienda sia pool di sieri dei 5 suinetti selezionati per scrofa che i corrispettivi pool di emosieri testicolari sono risultati negativi, anche nel pool di emosieri testicolari corrispondente a tutte le nidiate (35 soggetti) non è stata rilevata la presenza del virus della PRRS.
I risultati ottenuti sono raccolti in tabella 1.

Azienda	n°	Risultato sieri	Risultato emosieri	Risultato pool
A	1	Neg	Neg	Pos (Ct=26,08)
A	2	Neg	Neg	
A	3	Neg	Neg	
A	4	Neg	Neg	
A	5	Pos (Ct=31,07	Pos (Ct=22,53)	
B	1	Neg	Neg	Neg
B	2	Neg	Neg	
B	3	Pos (Ct=36,05)	Pos (Ct=35,93)	
B	4	Neg	Neg	
B	5	Neg	Neg	
B	6	Neg	Neg	
B	7	Neg	Neg	
B	8	Neg	Pos (Ct=37,92)	
B	9	Neg	Neg	
B	10	Neg	Neg	
C	1	Neg	Neg	Neg
C	2	Neg	Neg	
C	3	Neg	Neg	
C	4	Neg	Neg	
C	5	Pos (Ct=35,81)	Neg	
C	6	Pos (Ct=33,67)	Neg	
C	7	Neg	Neg	
C	8	Neg	Neg	
C	9	Neg	Neg	
C	10	Neg	Neg	
D	1	Neg	Neg	Neg
D	2	Neg	Neg	
D	3	Neg	Neg	
D	4	Neg	Neg	
D	5	Neg	Neg	
D	6	Neg	Neg	
D	7	Neg	Neg	

Tabella 1: Risultati
Table 1: *Results*

Il calcolo dell'indice K di Cohen ha evidenziato una concordanza moderata tra le due matrici (K=0,520); la concordanza si eleva a buona, secondo la scala di Landis e Koch, se si esclude la positività data dalla vaccinazione (K=0,783).

	Pos sieri	Neg sieri	
Pos emosieri	2	1	3
Neg emosieri	2	27	29
	4	28	32

Tabella 2: Matrice per il calcolo dell'indice K di Cohen
Table 2: *Matrix for Cohen K evaluation*

DISCUSSIONE

Il confronto tra i campioni di siero di sangue ed emosiero testicolare prelevati dagli stessi soggetti ha mostrato una buona concordanza.

I risultati ottenuti analizzando in pool tutte le nidiate dell'allevamento B (pool di 5 soggetti per 10 nidiate per un totale di 50 soggetti) suggeriscono che questo metodo di campionamento possa portare ad eccessiva diluizione del campione e ad ottenere, di conseguenza, risultati falsamente negativi nel caso in cui i titoli virali siano bassi evidenziati dai valori di Ct elevati. Questo dato conferma quanto già osservato in alcuni studi presenti in letteratura (Sol e Jansen, 2018; Vilalta et al., 2018).

Un'altra considerazione da fare è legata alla presenza di un campione di emosieri testicolari di una singola covata (5 soggetti) risultato positivo mentre il pool di 5 sieri corrispondenti è risultato negativo. Questo dato può suggerire una maggiore sensibilità del campione di emosieri testicolari a fronte di una corrispondenza dei soggetti analizzati, ipotesi supportata anche dal fatto che nella nidiata positiva dell'azienda A il valore di Ct del pool di emosieri è risultato più basso, a indicazione di una maggiore carica virale.

CONCLUSIONI

La possibilità di utilizzare a fini diagnostici un materiale di scarto di un'attività di routine negli allevamenti suinicoli per il monitoraggio della PRRS, rappresenta un indubbio vantaggio in quanto permette di evitare un ulteriore manipolazione stressante per i suinetti sottoscrofa, categoria di animali nella quale il prelievo di fluidi orali non permette la raccolta di sufficiente materiale da sottoporre ad analisi. I risultati ottenuti confermano che è possibile utilizzare gli emosieri testicolari come matrice d'analisi per la diagnosi di PRRS in suinetti sottoscrofa. Il ricorso all'utilizzo di campioni aggregati nel monitoraggio delle malattie infettive, quali per esempio tamponi ambientali, campioni di aria e, non da ultimo, fluidi orali è sempre più frequente e rappresenta una valida modalità di massimizzare la resa dei costi derivanti dalle analisi di laboratorio. Tenuto conto del costo delle singole analisi è evidente che tramite la raccolta di campioni aggregati di tessuti provenienti da un numero elevato di soggetti è possibile limitare la spesa relativa. Il costo derivante dalle analisi per il monitoraggio della PRRS nei suinetti sottoscrofa utilizzando un campione "di convenienza" costituito da 30 prelievi di sangue di suinetti costituenti a loro volta 6 pool di siero ha un costo di circa 130 € che potrebbero essere utilizzati per le analisi di 6 emosieri testicolari aumentando notevolmente la rappresentatività del campione.

In ragione degli aspetti epidemiologici intra-aziendali specifici della PRRS, la nuova matrice

oggetto di questo studio, qualora utilizzata con regolarità, può rappresentare un utile strumento per la diagnosi precoce dei casi di recrudescenza e può essere di notevole ausilio diagnostico per la rilevazione di PRRSV nelle aziende in cui la prevalenza virale è prossima allo zero.

BIBLIOGRAFIA

1. Gillespie T.G. "Novel PRRSV detection technique used as a part of a PRRSV elimination program". 25th IPVS Proceedings Volume 1, p. 166, 11-14 Giugno 2018, Chongqing, Cina.
2. 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. (2010). Terminology for classifying swine herds by porcine reproductive and respiratory syndrome virus status. J Swine Health Prod. 2011;19(1):44-56.
3. Prickett JR, Zimmermann JJ. The development of oral fluid-based diagnostic and applications in veterinary medicine. Anim Health Res Rev. 201; 11(2): 207-216.
4. Sol R., Jansen R. "The use of processing fluids compared to serum for determination the PRRS type 1 status of neonatal piglets on a commercial Dutch farm". 25th IPVS Proceedings Volume 1, p. 166, 11-14 june 2018, Chongqing, Cina.
5. Vilalta C., Sanhueza J., Alvarez J.,, Murray D., Torremorell M., Corzo C., Morrison R. "Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs" Veterinary Microbiology 225 (2018) 149-156 https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.09.006

VALUTAZIONE DELLA SENSIBILITÀ IN VITRO DI CEPPI DI *BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE* ISOLATI NEL PERIODO 2005-2018 IN ITALIA

IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF BRACHYSPIRA HYODYSENTERIAE STRAINS ISOLATED IN ITALY FROM 2005 TO 2018

BONILAURI P., PANGALLO G., LUPPI A., GHERPELLI Y., DE LORENZI G., LEONELLI R., DOTTORI M., MERIALDI G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia ed Emilia Romagna

Parole chiave: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae,* antibiotico resistenza.
Key words: MIC, *Brachyspira hyodysenteriae,* antimicrobial resistance.

RIASSUNTO

In questo studio sono riportati i risultati della determinazione della minima concentrazione inibente (MIC) di 353 ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati in Italia nel periodo 2005-2018 nei confronti dei seguenti antibiotici: doxiciclina, lincomicina, tiamulina, tilosina, tilvalosina e valnemulina. Il 70% dei ceppi è risultato resistente o a ridotta sensibilità per tiamulina e valnemulina, mentre il 67% dei ceppi è risultato pienamente sensibile a tilvalosina. Le MIC50 e MIC90 degli altri antibiotici testati sono risultate molto elevate, indicando una elevata diffusione della resistenza nel batterio. Valutando l'andamento temporale della prevalenza dei ceppi a ridotta sensibilità nell'intervallo temporale studiato, si osserva come la prevalenza dei ceppi cosiddetti *wild type* (con MIC inferiori al *break point* epidemiologico) appaia in diminuzione, confermando una progressiva diffusione sul territorio di ceppi resistenti o a ridotta sensibilità.

ABSTRACT

In this study the minimum inhibitory concentration (MIC) of 353 strains of *Brachyspira hyodysentaeriae* isolated in Italy in the period 2005-2018 versus doxycycline, lincomycine, tiamulin, tylosin, tilvalosine and valnemulin are reported. 70% of the tested strains resulted resistant or not fully susceptible to tiamulin and valnemulin. 67% of the tested strains resulted fully susceptible to tilvalosin. MIC 50 and MIC 90 values for the other antibiotics are very high suggesting an extended presence of resistant strains. The evaluation of trends during the considered period shows a decreasing rate of fully of wild type strains (with MIC lower than the epidemiological cut off) over time, confirming the threat that resistant and not fully susceptible strains are continuously spreading over the considered area.

INTRODUZIONE

Brachyspira hyodysenteriae è stata identificata per la prima volta nel 1920 ma è stata definitivamente individuata quale agente eziologico della dissenteria emorragica (SD) del suino soltanto nei primi anni '70 del secolo scorso (Taylor and Alexander, 1971; Glock and Harris, 1972; Harris et al., 1972b). La SD è una malattia enterica trasmissibile tipica delle fasi di magronaggio ed ingrasso che continua a causare gravi problemi economici nell'allevamento suino in tutto il mondo, dovuti alla mortalità dei soggetti colpiti, al lento accrescimento, alla scarsa conversione dell'alimento ed ai costi dei trattamenti. La malattia è ancora ben presente e spesso grave negli allevamenti di suini pesanti, in Italia. Clinica-

mente la dissenteria è caratterizzata da una diarrea muco-emorragica causata dalla colonizzazione dell'epitelio cieco-colico che conduce i soggetti colpiti a perdita di peso, disidratazione, cachessia e, nei casi più gravi, a morte con mortalità che può arrivare al 30% e morbilità anche al 90% nei casi più gravi (Wannemueler, 1993). Allo stato attuale delle conoscenze, data l'assenza di vaccini di comprovata efficacia, il controllo della malattia si attua essenzialmente tramite la combinazione di interventi gestionali e di trattamenti farmacologici. La presenza di ceppi resistenti o multi-resistenti a tutti i farmaci autorizzati per l'allevamento suino in Italia è stata riportata fin dal 2004 (Bonilauri et. al 2004) ed è comunque esperienza comune in Europa l'osservazione di ceppi di *B. hyodysenteriae* a ridotta sensibilità a differenti antibiotici (Rohde et al., 2004; Hidalgo et al., 2009; Pringle et al., 2012). Inoltre, le condizioni igienico sanitarie dell'allevamento, le dinamiche dei flussi degli animali, le pratiche di lavaggio e disinfezione degli ambienti rappresentano determinanti altrettanto imprescindibili nella valutazione dell'efficacia del trattamento farmacologico (Merialdi 2013).

Dal 1999 l'isolamento da campioni clinici di suini (feci , tamponi e visceri) di *B. hyodysenteriae* e delle altre spirochete intestinali (*B. innocens, B. murdochii, B. intermedia* e *B. pilosicoli*), è stato eseguito in modo ripetuto e continuo e i dati di sensibilità in vitro a differenti farmaci antimicrobici è stata testata tramite MIC. Fino al 2004 i dati di sensibilità in vitro sono stati ottenuti tramite metodica QUIKMIC in agar precedentemente descritta (Bonilauri et. al 2003). Dal 2005 si è passati alla determinazione della MIC in brodo in quanto questa metodologia permette una determinazione della sensibilità ai farmaci antimicrobici maggiormente precisa e ripetibile. I dati relativi alla sensibilità in vitro per le pleuromutiline (Tiamulina e Valnemulina) relativi a parte dei ceppi isolati nel periodo 2003–2012 sono stati precedentemente riportati in Rugna et. al. (2015). Scopo del presente lavoro è quello di riportare di dati sensibilità in vitro nei confronti di doxiciclina, tilosina, tilvalosina, tiamulina e valnemulina ottenuti sui ceppi isolati dal 2005 al 2018, aggiornando e completando quanto precedentemente pubblicato.

MATERIALI E METODI

Isolamento e determinazione della MIC

In questo studio sono stati inclusi 353 ceppi di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati a partire da campioni di carcasse, visceri e feci di suini di peso compreso fra 30 e 150 Kg con forme diarroiche di varia natura conferiti tra il 2005 e 2018 alla Sede Territoriale di Reggio Emilia dell'IZSLER. L'esame colturale per *B. hyodysenteriae* e l'identificazione in specie sono stati condotti secondo la metodologia standard. In breve, il materiale patologico è stato seminato su terreno B.A.M e incubato per 5 giorni a 37°C in anaerobiosi. La presenza di *Brachyspira spp.* è stata confermata tramite osservazione microscopica a contrasto di fase e ingrandimento a 400x e la tipizzazione di specie è stata ottenuta tramite valutazione della forza dell'emolisi mostrata dai ceppi e confermata tramite PCR (Leser et al. 1997, Fellstrom 1997, Atyeo et al 1999 e La et al. 2006). I ceppi di *B. hyodysenteriae* indirizzati alla determinazione della MIC sono stati sospesi in 2 ml di brodo BHI con aggiunta di 10% di siero fetale bovino in modo da ottenere una sospensione batterica contenente 10^8 ufc/ml. La sensibilità *in vitro* di tutti i ceppi di *B. hyodysenteriae* in esame è stata valutata nei confronti di doxiciclina, lincomicina, tiamulina, tilosina, tilvalosina e valnemulina, tramite il kit commerciale VetMIC Brachy (National Veterinary Institute, SVA, Sweden) ed applicando le procedure indicate dal CLSI M31-A3 (Edition, Approved Standard-Third. "CLSI documents M31-A3." Clinical and Laboratory Standards Institute 940.). Il ceppo WA6 (B. hyodysenteriae, ATCC 49527) è stato usato come ceppo di controllo. Le piastre, una volta allestite, sono state incubate in anaerobiosi a 37° per 4 giorni.

Analisi statistica e Interpretazione della MIC

I dati di MIC per ogni antibiotico testato sono stati rappresentati come MIC50 e MIC90, rispettivamente il valore di MIC in grado di inibire il 50% ed il 90% dei ceppi testati. Nella valutazione dell'andamento temporale dei valori di MIC osservati i ceppi sono stati arbitrariamente suddivisi in 2 raggruppamenti, 2005-2012, e 2013-2018. Il confronto tra la distribuzione in classi di frequenza nei 2 periodi è stato effettuato tramite test Chi2 di Pearson utilizzando il software STATA 7.0, il livello di significatività è stato posto a $p<0.01$.

L'interpretazione dei valori di MIC osservati in termini di efficacia in vitro del farmaco è stata la seguente: Tilvalosina: sensibile <=16 µg/mL - intermedio 32 µg/mL - resistente >32 µg/mL --- Tiamulina: sensibile <1 µg/mL - intermedio 1-4 µg/mL - resistente >4 µg/mL --- Valnemulina: : sensibile <1 µg/mL - intermedio 1-4 µg/mL - resistente >4 µg/mL, secondo quanto pubblicato da Rønne H. e Szancer (1990) e da Tasker et al. 2004, per gli altri antibiotici testati non è possibile esprimere una interazione in termini di efficacia della MIC osservata per mancanza di brack point validati

RISULTATI

+ngono rappresentati per l'intero periodo monitorato e suddivisi arbitrariamente in 2 periodi di tempo: 2005-2012 e 2013-2018. Per ogni antibiotico testato il valore di MIC50 e MIC90 osservato in tutto il periodo di tempo considerato è riassunto testato in tabella 1. La distribuzione dei valori di MIC osservati relativamente all'intero periodo di tempo e separatamente nei periodi considerati, sono rappresentati in figura 1.

Tabella 1: MIC50 e MIC90 e range di 5 antibiotico nei confronti di ceppi italiani di *Brachyspira hyodysenteriae* isolati tra il 2005 e il 2018.

Table 1: MIC50, MIC90, and ranges for five antimicrobial agents against Italian field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* recovered between 2005 and 2018

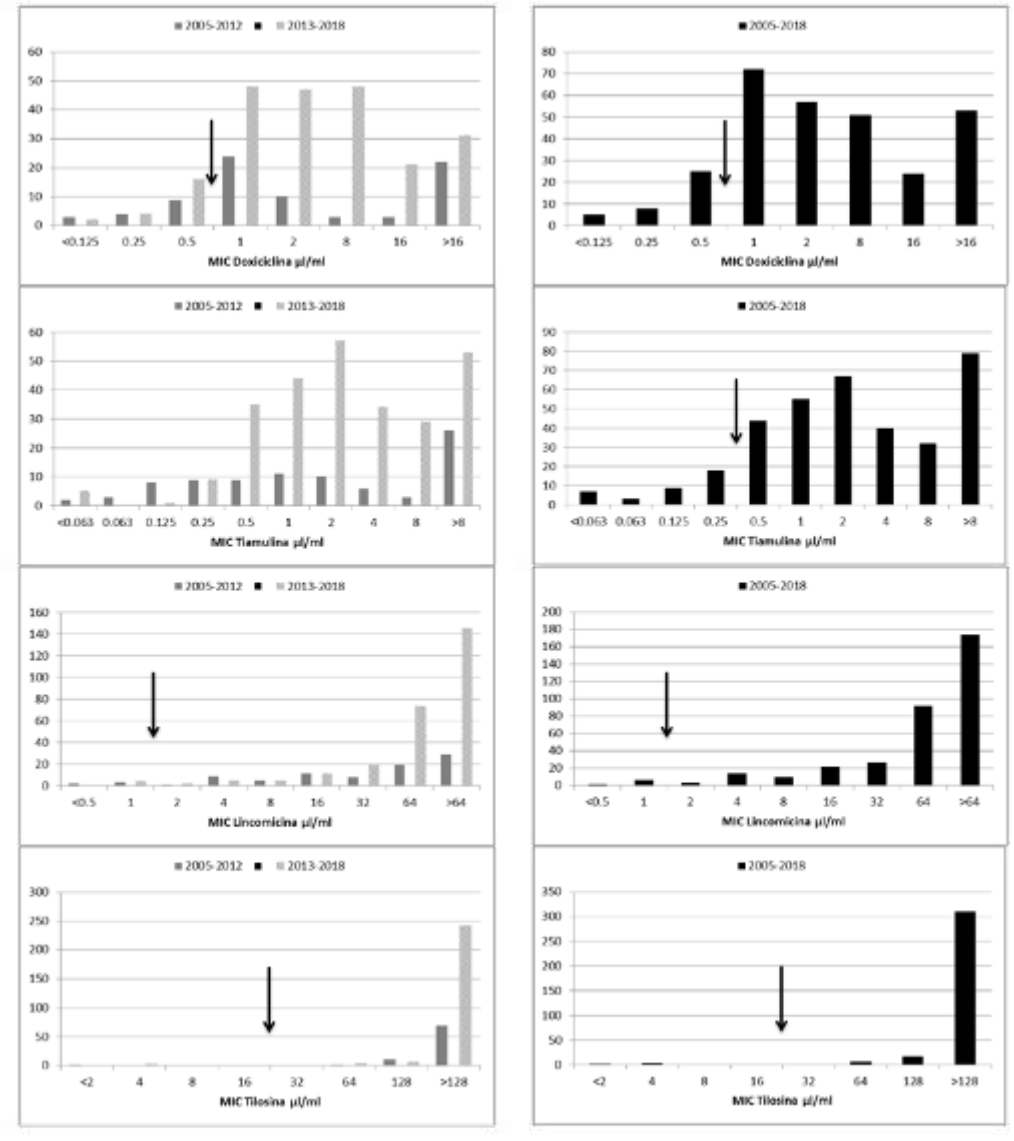
ANTIBIOTICO	n	MIC50 µl/ml	MIC90 µl/ml	range
doxiciclina	343	4	>16	<0.125->16
lincomicina	328	64	>64	<0.4->64
tiamulina	353	2	>8	<0.063->8
tilosina	343	>128	>128	<2->128
tilvalosina	331	16	>32	0.25-64
valnemulina	353	2	>4	<0.031->4

Relativamente all'interpretazione delle MIC sulla bese dei break point validati disponibili, si conferma l'elevata presenza di ceppi a ridotta sensibilità per le pleuromutiline (70% del totale dei ceppi esaminati) . Tilvalosina è risultata invece sensibile pienamente efficace nel 67% dei ceppi testati.(tab.2),

Tabella 2: distribuzione in classi di sensibilità dei ceppi italiani di *Brachyspira hyodysenteriae*

isolati tra il 2005 e il 2018 per gli antibiotici tiamulina, tilvalosina e valnemulina.
Table 2: sensitivity distribution of tiamulin, tylvalosin e valnemulin against Italian field isolates of Brachyspira hyodysenteriae recovered between 2005 and 2018.

ANTIBIOTICO	SENSIBILE	INTERMEDIO	RESISTENTE
TIAMULINA	81(23%) (<=1 µl/ml)	161(46%) (1 µl/ml-4 µl/ml)	111(31%) (>4 µl/ml)
TILVALOSINA	221(67%) (<16 µl/ml)	54 (16%) (32 µl/ml)	56(17%) (>32 µl/ml)
VALNEMULINA	99(28%) (<=1 µl/ml)	179 (51%) (1 µl/ml-4 µl/ml)	75(21%) (>4 µl/ml)



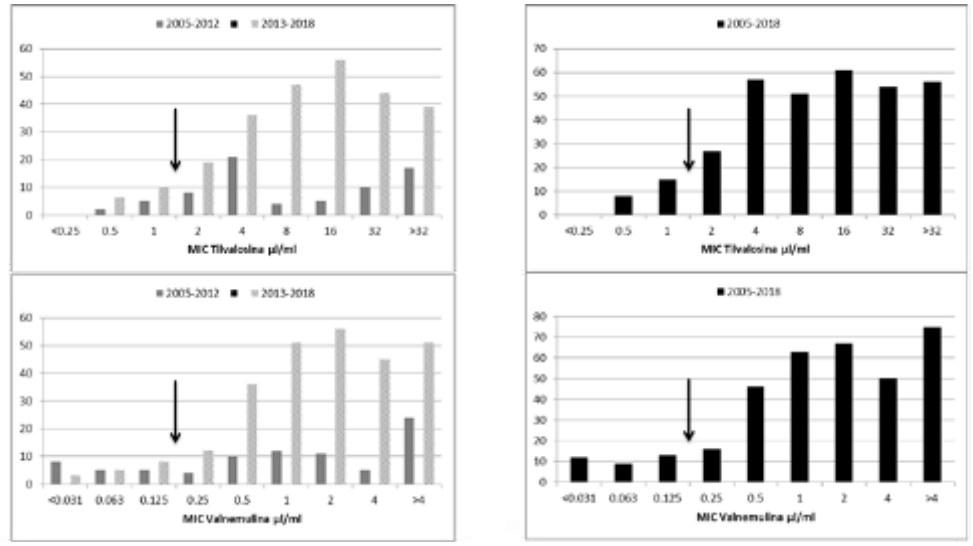


Figura 1: Suscettibilità antimicrobica: distribuzione degli isolati di *B. hyodysenteriae* di campo italiani del valore di MIC per i sei agenti antimicrobici testati. Le frecce indicano i valori di cut-off epidemiologici proposti in Pringle et al. (2012).
Figure 1: Antimicrobial susceptibility : distribution of MIC of six antimicrobial agents for Italian field isolates of B. hyodysenteriae. Arrows indicate proposed wild type cutoff values proposed by in Pringle et al. (2012).

Nella figura 1 troviamo la distribuzione dei ceppi di *B. hyodysenteriae* in classi di frequenza per i 5 antibiotici testati sia considerando tutto il periodo di tempo compreso tra il 2005 ed il 2018 sia suddividendo temporalmente i ceppi nei due intervalli di tempo considerati. Con la freccia è indicato il cut-off epidemiologico proposto da Pringle et al. (2012) sulla base dei risultati ottenuti in ceppi svedesi. La doxiciclina nell'intero periodo mostra un tipico andamento bimodale, con una buona presenza di ceppi a MIC=1 accompagnati da una quasi altrettanto numerosa presenza di ceppi a MIC>16. Discorso simile anche per la Tiamulina, dove è la classe di ceppi a MIC=2 risulta ben rappresenta, ma la moda della distribuzione è rappresentata dalla classe di ceppi a MIC>8. La distribuzione dei ceppi per lincomicina invece presenta una forte asimmetria a destra, con la larga maggioranza dei ceppi presentanti MIC≥64. Identico andamento presenta la distribuzione dei ceppi nelle MIC per Tilosina, dove si conferma la assoluta resistenza della totalità dei ceppi testati, come oramai assodato da anni. Situazione di difficile interpretazione per la Tilvalosina che presenta una curva di tipo rettangolare con equale rappresentazione dei ceppi tra MIC4 e MIC>32, che comunque consente di osservare la presenza di ceppi classificati come sensibili in vitro (67% tab.2). Infine anche per Valnemulina si osserva una certa equi rappresentanza di ceppi con MIC comprese tra 1 e >4, che però in questo caso rappresenta una alta frequenza di ceppi a ridotta sensibilità per questo antibiotico (72% tab.2).
Venendo all'analisi temporale , per doxiciclina, tiamulina, tilvalosina e valnemulina la distribuzione in classi di MIC risulta differente nei due periodi doxiciclina (Pearson chi2(7) = 30.1 p < 0.001) , tiamulina (Pearson chi2(9) = 48.9 p< 0.001) tilvalosina (Pearson chi2(7) = 24.9 p=0.001) e valnemulina (Pearson chi2(8) = 30.8 p< 0.001). In particolare, le classi al di sotto del cut-off epidemiologico, identificanti probabili ceppi *wild type* , risultano

maggiormente rappresentate nel primo periodo di tempo considerato (2005-2012), ad esempio per Doxiciclina i ceppi al di sotto del cut-off di 0.5 µl/ml erano il 20.5% tra il 2005 ed il 2012 e si riducono al 10.1% tra il 2013-2018. Per Tiamulina i ceppi presunti *wild type* scendono dal 25.3% del primo periodo di tempo al 5.6% dell'ultima rilevazione, una stessa riduzione di ceppi *wild type* si è osservata per Valnemulina dove rispetto al primo periodo di tempo (21.4%) si è passati ad un 6% soltanto tra il 2013 ed il 2018. Minore, ma comunque presente e significativa la riduzione per Tilvalosina, dove i ceppi *wild type* passano dal 12.7% al 7.3% confrontando i due periodi di tempo.

DISCUSSIONE

Tutti i risultati sono stati ottenuti applicando il medesimo metodo attraverso l'utilizzo dello stesso kit commerciale. I risultati dei ceppi di controllo, sempre presenti ad ogni seduta, hanno dato i risultati attesi confermato la qualità dei risultati nel tempo.

Comparando i risultati ottenuti con quelli presenti in letteratura, la situazione italiana appare piuttosto preoccupante. Rispetto ai ceppi svedesi pubblicati da Pringle et al.2012 riferibili all' intervallo temporale 1990 – 2010 su un paragonabile numero di ceppi (582), i dati italiani mostrano una distribuzione dei ceppi con MIC superiore al cut-off epidemiologico proposto dagli autori svedesi nettamente superiore. Come si vede in figura 1, adottando il medesimo livello di cut-off proposto per l'utilizzo in Svezia al fine di monitorare la presenza di ceppi a ridotta sensibilità ai farmaci (definiti come non selvaggi - *non-wild type*) l'Italia vedrebbe per tutti gli antibiotici considerati una larga maggioranza di ceppi definibili come "non selvaggi". Situazione ancora più favorevole è stata riportata per ceppi polacchi da Zmudzki et al. 2012, dove sono stati riportati dati su ceppi isolati tra il 2006 ad il 2010 (n=25) e dove le totalità dei ceppi testati mostra MIC <1µg/mL per Tiamulina e <2 µg/mL per Valnemulina e Doxiciclina. In Svizzera è stata riportata una situazione decisamente favorevole infatti Kirchgässner et. al. (2016) riporta per 30 ceppi isolati sul territorio elvetico tra il 2009 ed il 2015 una elevata sensibilità per Tiamulina e Valnemulina con la totalità dei ceppi inibiti già alla concentrazione di 0.125 µg/mL e un MIC range per doxiciclina ≤0.25 µg/mL (47%) - 2 µg/mL (10%), Lincomicina ≤0.5 µg/mL (30%) and 32 µg/mL (43%) – tilavalosina ≤0.25 µg/mL (10%) and 8 µg/mL (20%). Anche rispetto a dati rilevati in Spagna (Hidalgo 2009; 87 ceppi tra il 2008 ed il 2009) la nostra situazione appare peggiore (MIC50 per tiamilina, valnemilina = 1 µg/mL e MIC90 = a 8 µg/mL e 4 µg/mL rispettivamente – Tilvalosina MIC50 = a 4 µg/mL per MIC90 = 16). Soltanto in repubblica Ceca (Šperling et al. 2011 a Taiwan (Yeh et al. 2018) sono stati osservati ceppi di *B. hyodysenteriae* a ridotta sensibilità ai farmaci disponibili in proporzioni simili a quelle osservate sul territorio italiano. Anche relativamente all'analisi temporale appare evidente come tra i ceppi isolati tra il 2013 ed il 2018 vi siano significativamente meno ceppi *wild-type* per Doxiciclina, Tiamulina, Tilvalosina e Valnemulina , testimoniando che la situazione generale è evidentemente peggiorata e questi ceppi pienamente sensibili ai farmaci testati siano oramai una minoranza sul territorio nazionale.

Se si esclude la resistenza a Tilosina che viene a determinarsi per una semplice mutazione puntiforme nel gene del RNA ribosomiale 23S bersaglio del farmaco (Karlsson et al. 1999 e 2004) e che è stato dimostrato si manifesta frequentemente dopo pochi passaggi dei ceppi *in vitro* in presenza di concentrazione sub-letali del farmaco, lo sviluppo delle resistenze ai farmaci in *B. hyodysenteriae* è un fenomeno complesso. Ad esempio per la Tilvalosina, che è anch'essa un macrolide, è stata ipotizzata la cross-resistenza con la Tilosina (Karlsson et al. 2004), ma questa evidenza non è stata dimostrata successivamente in quanto Pringle et al. (2012) hanno descritto ceppi completamente resistenti a Tilosina mostrare MIC molto basse per Tilvalosina. Una situazione simile è osservabile anche tra i ceppi italiani qui presentati, dove la quasi totalità di questi ha mostrato MIC contro Tilosina >128 µg/mL, ma la questi

stessi ceppi hanno una distribuzione di MIC nei confronti di Tilvalosina equamente distribuita tra tutti i valori di concentrazione testati. Per questo farmaco utilizzando il *breack point* della resistenza a >16 µl/ml che risulta anche quello suggerito come BP clinico da Burch (2005) quasi il 70% dei ceppi testati in tutto il periodo risulterebbe sensibile al farmaco. Va tuttavia osservato che anche per questo farmaco, si è osservata la riduzione dei ceppi *wild type* nell'ultimo periodo di tempo considerato. Inoltre tra il 2013 ed il 2018 si può osservare come le MIC si distribuiscono in modo unimodale con moda a 16, che indica come la situazione attuale potrebbe velocemente peggiorare nei prossimi anni. Per l'istaurazione della resistenza alla Doxiciclina è stata ipotizzata una mutazione puntiforme sul gene del 16S rRNA (Pringle et al. 2007 ; Verlinden et al. 2011), la presenza di questa mutazione porterebbe le MIC a valori >0.5 µl/ml. Tra i ceppi italiani quelli a MIC per Doxiciclina inferiore a <0.5 µl/mL, supposti *wild type* rappresentano soltanto il 13% nell'intero periodo e scendono al 10% negli ultimi 5 anni.

La resistenza a Tiamulina è un fenomeno oltremodo complesso e compare in più step che comportano mutazioni successive nei siti di riconoscimento del farmaco sul ribosoma (Hidalgo et al. 2011 e Pringle et al. 2004). Ogni mutazione determina un incremento nel livello di MIC osservato tra i ceppi, pur tuttavia esistono ceppi che non mostrano nessuna mutazione nei siti noti per la resistenza che presentano comunque MIC >8 µl/mL (Pringle et. al 2012). Per Valnemulina spesso i risultati sono concordi, anche se il valore di MIC risulta di una o due diluizioni più bassa.

Per i ceppi di *B. hyodysenteriae* italiani risulta oramai consolidato il fenomeno della multi esistenza a tutti i farmaci autorizzati. Considerando l'intervallo temporale 2015-2018, i ceppi con MIC > 1 µl/mL per Tiamulina (n=98 su 150) sono risultati sempre > 1µl/mL per Valnemulina, sempre >0.5 per Doxiciclina, sempre >128 µl/mL per Tilosina, >36 µl/mL per Lincomicina nel 95% dei casi e nel 44% dei casi >16 µl/mL per Tilvalosina, portando la presenza di ceppi multi resistenti al 65%. Questo fenomeno era già stato segnalato da noi nel 2004 dove questi ceppi multi-resistenti risultavano essere però soltanto il 15% del totale (Bonilauri et al. 2004).

Alla luce di questo, la scelta delle molecole da utilizzare nella terapia della dissenteria emorragica in Italia è molto limitata e dovrebbe sempre essere accompagnata da una preventiva determinazione della MIC *in vitro*.

BIBLIOGRAFIA

1. Atyeo R.F., Stanton T.B., Jensen N.S., Suriyaarachichi D.S, Hampson D.J. (1999) - Differentiation of Serpulina species by NADH oxidase gene (nox) sequence comparisons and nox-based polymerase chain reaction tests. Vet. Microbial. 67. 47-60.
2. Bonilauri, P., Merialdi, G., Granelli, F., Luppi, A., & Dottori, M. (2003). In vitro susceptibility of Brachyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli strains from 1999 to 2002 [swine]. *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (Italy)*.
3. Bonilauri, P., Merialdi, G., Calzolari, M., Luppi, A., & Dottori, M. (2004). Increase of multi-resistant strains of Brachyspira hyodysenteriae in Italian swine herds. Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (Italy).
4. Buller NB, Hampson DJ (1994). Antimicrobial susceptibility testing of Serpulina hyodysenteriae. American Veterinary Journal 71, 211-214;
5. Burch D.G.S. (2005) Pharmacokinetic, pharmacodynamic and clinical correlations relating to the therapy of colonic infections in the pig and breakpoint determinations. The Pig Journal 56, 8-24
6. Cizek A., Lobova D., Smola J. (2002). *In vitro* susceptibility of *Brachyspira hyodysenteriae* strains isolated in the Czech republic from 1996 to 2001. Proceeding of the 17th

Congress of the International Pig Veterinary Society. June 2-5, 2002 Ames, Iowa USA, 366;
7. De Luca S., Nicholson P., Magistrali C., García-Martín A., Rychener L., Zeeh F., Frey J., Perreten V. Transposon-associated lincosamide resistance lnu(C) gene identified in Brachyspira hyodysenteriae ST83. Veterinary Microbiology, Volume 214, 2018, Pages 51-55;
8. Fellstrom C., Patterson B., Thomson, Gunnarson A., Persson M., Johansson K.E. (1997) – Identification of Serpulina species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 462-467.
9. Gasparrini S, Alborali GL, Pitozzi A, Guarneri F, Giacomini E, Baldo V, Scali F, Lazzaro M, Boniotti MB. Characterization of Brachyspira hyodysenteriae isolates from Italy by multilocus sequence typing and multiple locus variable number tandem repeat analysis. J Appl Microbiol. 2017 Aug;123(2):340-351;
10. Glock R. D., Harris D. L.: Swine Dysentery II. Characterization of Lesions in Pigs Inoculated with Treponema hyodysenteriae in Pure and Mixed Culture. Vet. Med. Small Anim. Clin. 1972, 67: 65–68.
11. Kirchgässner, C., Schmitt, S., Borgström, A., & Wittenbrink, M. M. (2016). Antimicrobial susceptibility of Brachyspira hyodysenteriae in Switzerland. Schweizer Archiv fur Tierheilkunde, 158(6), 405-410.
12. Karlsson M, Fellström C, Heldtander MU, Johansson K-E, Franklin A: Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae. FEMS Microbiol Lett 1999, 172:255–260.
13. Karlsson M, Fellström C, Johansson KE, Franklin A: Antimicrobial resistance in Brachyspira pilosicoli with special reference to point mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide and lincosamide resistance. Microb Drug Resist 2004, 10:204–208.
14. Harris D. L., Glock R. D., Christensen C. R., Kinyon, J. M.: Swine Dysentery I, Inoculation of Pigs with Treponema hyodysenteriae (New Species) and Reproduction of Disease. Vet. Med. Small Anim. Clin. 1972b, 67: 61–64.
15. Hidalgo À., Carvajal A., García-Feliz C., Osorio J., Rubio P.: Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of Brachyspira hyodysenteriae . Res. Vet. Sci. 2009, 87: 7–12
16. Yeh, J. C., Lo, D. Y., Chang, S. K., & Kuo, H. C. (2018). Antimicrobial Susceptibility Patterns of Brachyspira Species Isolated in Taiwan. Microbial Drug Resistance, 24(5), 685-692.
17. La, T., Collins, A. M., Phillips, N. D., Oksa, A., & Hampson, D. J. (2006). Development of a multiplex PCR for rapid detection of the enteric pathogens Lawsonia intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae, and Brachyspira pilosicoli in porcine faeces. Letters in applied microbiology, 42(3), 284-288.
18. Leser T.D., Moller M., Jensen T.K., Jorsal S.E. (1997) - Specific detection of Serpulina hyodysenteriae and potentially pathogenic weakly beta-haemolytic porcine intestinal spirochetes by polymerase chain reaction targeting 23S rDNA. Mol. Cell. Probs 11:363-372.
19. Merialdi 2013: Coliti da *Brechyspira* in „Le patologie del maiale.“ a cura di Martelli P. Le Point Vétérinaire Italie, Milano (2013).
20. Pringle M, Fellström C, Johansson KE: Decreased susceptibility to doxycycline associated with a 16S rRNA gene mutation in Brachyspira hyodysenteriae. Vet Microbiol 2007, 123:245–248.
21. Pringle M., Landén A., Unnerstad H. E., Molander B., Bengtsson B.: Antimicrobial susceptibility of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* isolated in Sweden between 1990 and 2010. Acta Vet. Scand. 2012, 54
22. Rohde J., Kessler M., Baums C. G., Amtsberg G.: Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for Brachyspira hyodysenteriae isolated in Germany. Vet. Microbiol. 2004, 102: 25–32
23. Rønne H., Szancer J. (1990). “In vitro susceptibility of danish isolates *of Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery therapy. Proc. Int. Congr. Pig Vet. Soc. 1990, 126.
24. Rugna G., Bonilauri P., Carra E., Bergamini F., Luppi A., Gherpelli Y., Magistrali C.F., Nigrelli A., Alborali G.L., Martelli P., La T., Hampson D.J., Merialdi G. Sequence types and pleuromutilin susceptibility of Brachyspira hyodysenteriae isolates from Italian pigs with swine dysentery: 2003–2012. The Veterinary Journal, Volume 203, Issue 1, 2015, Pages 115-119.
25. Šperling, D., Smola, J., & Čížek, A. (2011). Characterisation of multiresistant Brachyspira hyodysenteriae isolates from Czech pig farms. Veterinary Record, 168(8), 215-215.
26. Tasker J. B., Winkelman N. L. & Kirwan P. (2004) Use of aivlosin in feed for control of ileitis in USA and Europe. Proceedings of the 18th International Pig Veterinary Society Congress. Hamburg, June 27 to July 1, 2004. p 256.
27. Taylor D.J., Alexander T.J.L. (1971) “The production of dysentery in swine by feeding coltures containing a spirochaete”. Br. Vet. J., 127, 58-61;
28. Wannemueler M.J. (1993) «Entèrite hèmorragique du porc: depistage et ètude clinique». Rec. Med. Vet., 169 (8/9), 703-707.
29. Verlinden M, Boyen F, Pasmans F, Garmyn A, Haesebrouck F, Martel A: Antimicrobial susceptibility pattern of Brachyspira intermedia isolates from European layers. Microb Drug Resist 2011, 17:485–488.
30. Zmudzki, J., Szczotka, A., Nowak, A., Strzelecka, H., Grzesiak, A., & Pejsak, Z. (2012). Antimicrobial susceptibility of Brachyspira hyodysenteriae isolated from 21 Polish farms. Polish journal of veterinary sciences, 15(2), 259-265.

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI IN UN ALLEVAMENTO DI SUINI DOPO LA SOSPENSIONE DELL'UTILIZZO DEGLI ANTIBIOTICI

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI STRAINS ISOLATED FROM PIGS AFTER SUSPENSION OF GROUP ANTIBIOTIC TREATMENT

DE LUCIA A.[1], OSTANELLO F.[1], SMITH R.P.[3], DAVIES R.[2], CARD R. M.[2], RAMBALDI M.[1], MARTELLI F.[2]

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

Parole chiave: antibiotico resistenza, suini, *E.* coli
***Key words*:** antimicrobial resistance, pigs, *E.* coli

RIASSUNTO. Il settore suinicolo è tra primi per consumo di farmaci ad azione antimicrobica. L'uso e l'abuso di questi farmaci si è tuttavia accompagnato all' insorgenza e alla disseminazione di batteri antibioticoresistenti. In questo contesto è interessante verificare se interrompendo l'utilizzo di antibiotici, venga ripristinata la sensibilità di una popolazione batterica resistente. Il presente studio è stato condotto longitudinalmente per un periodo di 11 mesi, durante il quale sono state effettuate tre visite in un allevamento, in cui è stato interrotto l'uso rutinario di antibiotici. I risultati ottenuti hanno mostrato che la sospensione dell'utilizzo degli antibiotici ha portato ad una diminuzione delle resistenze per alcune delle molecole testate: ampicillina, trimetoprim-sulfadiazina ed aminoglicosidi seppur in misura inferiore. Nel complesso, gli antibiotici per i quali i ceppi di *E.* coli indicatori, isolati negli animali hanno mostrato più frequentemente resistenza sono: ampicillina, aminoclicosidi, sulfametossazolo e tetraciclina, che corrispondo alle molecole più comunemente utilizzate nell'allevamento del suino. è stato inoltre osservato che la frequenza di *E.* coli resistenti alle molecole testate si differenzia tra le diverse fasi produttive con la fase di svezzamento maggiormente critica, suggerendo l'esistenza di un reservoir di resistenze, nei recinti di questi animali, che potrebbero potenzialmente persistere e diffondersi anche a seguito di una riduzione di utilizzo di tali molecole.

ABSTRACT. The pig sector is among the primary livestock sectors in terms of consumption of antimicrobial drugs. The use and abuse of these drugs over many years has resulted in the emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria. In this context, it is interesting to verify if the susceptibility of bacterial population resistant to antimicrobials can be restored by halting their use. This study was carried out in a pig farm, which stopped routinely using antibiotics. The farm was followed longitudinally for eleven months and visited 3 times during this period. The restricted antibiotic use seems to have led to a decrease of resistance over time to some of the molecules tested such as ampicillin, trimethoprim-sulfadiazine and aminoglycosides, although on a smaller scale for the latter. High level of resistance among fecal *E.* coli isolates from healthy pigs was observed to tetracycline, sulfamethoxazole, ampicillin, and aminoglycosides reflecting extensive usage of these antimicrobials over many years in the pig industry. Different prevalences of *E.* coli resistant were observed between pig age classes. Isolates from weaners were more likely to be resistant compared with isolates

from finisher pigs. That could be due to the environmental saturation of resistance genes in weaner pens, and the likelihood that these genes could be transferred to other bacteria, maintaining a resistant *E.* coli strains in weaner pens even for a long time after cessation or marked reduction of antimicrobial usage.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il fenomeno dell'antibiotico resistenza ha subito un preoccupante incremento. Già nel 1942, pochi anni dopo la scoperta della penicillina, vennero isolati ceppi di *Staphylococcus* aureus, penicillino-resitenti (Lowy, 2003). Oggi, dopo mezzo secolo di uso terapeutico degli antibiotici, il fenomeno della resistenza è diventato un problema globale tanto da essere stato definito dal World Health Organization, una vera e propria emergenza sanitaria per il terzo millennio (WHO, 2017). Nell'allevamento suinicolo italiano viene fatto un ampio utilizzo di molecole ad azione antibatterica, sia a fini terapeutici sia per controllare la diffusione di infezioni batteriche. L'utilizzo degli antimicrobici contribuisce tuttavia all'acquisizione di resistenza agli stessi; batteri patogeni e commensali rispondono alla pressione selettiva esercitata da tali molecole, trasferendo e acquistando materiale genetico da organismi resistenti (**Österberg et al., 2016**). Tuttavia, i cambiamenti mutazionali dei batteri sono costosi per l'omeostasi cellulare e sono mantenuti solo se necessari in presenza dell'antibiotico (Munita and Arias, 2016).

In questo contesto è importante verificare se interrompendo l'utilizzo di antibiotici e neutralizzando così il vantaggio selettivo di resistenza, venga ripristinata la sensibilità di una popolazione batterica resistente.

Lo scopo del lavoro è stato quello di monitorare nel tempo la prevalenza e quantificare la resistenza ai comuni antibiotici di ceppi di *Escherichia coli*, isolati da campioni di feci, in un allevamento a ciclo chiuso, in cui è stato interrotto l'uso routinario di antibiotici.

MATERIALI E METODI

Allevamento

Lo studio è stato condotto in un allevamento a ciclo chiuso di circa 500 scrofe. I suini in svezzamento, magronaggio e ingrasso erano stabulati in tre diversi capannoni mentre scrofe e scrofette erano allevati all'aperto, in recinti dotati di capannine in grado di alloggiare collettivamente le scrofe gravide.

L'anamnesi riportava la presenza di problemi sanitari causati da *Salmonella* Typhimurim, con sintomatologia clinica nei suini svezzati. Per limitare le perdite produttive, per numerosi anni è stata utilizzata per i suinetti una dieta medicata con apramicina (APR) o trimetoprim-sulfadiazina (SXT). Lo studio è stato condotto longitudinalmente per un periodo di undici mesi, durante il quale sono state effettuate tre visite in allevamento, ad intervallo semestrale.

Prelievo dei campioni

Nel corso di ogni visita sono stati raccolti campioni di feci da 30 suini di ciascuna delle tre fasi produttive (post-svezzamento, magronaggio e ingrasso), per un totale di 90 campioni individuali. Successivamente, i campioni individuali di feci di ciascuna classe di età sono stati utilizzati per creare pool di feci, per un totale di 6 pool per gruppo di età.

Determinazione dei profili di antibiotico-resistenza

Al fine di rilevare e monitorare eventuali cambiamenti nei profili di resistenza e nei livelli di sensibilità agli antibiotici, ogni pool è stato seminato su un terreno selettivo per Escherichia coli (ChromAgar ECC). Da ciascuna piastra, dopo essere state incubate a 37±1

°C per 18 ore, 3 colonie sono state selezionate e purificate. Mediante MALDI-TOF si è poi proceduto all'identificazione di genere e specie.

Infine, su tutti gli isolati selezionati e confermati *E.* coli, *è stato effettuato il test della* Minima Concentrazione Inibente (MIC), usando la tecnica di diluizione agar del protocollo EU (ECDC, 2014). La differenziazione tra ceppi resistenti e sensibili, si è ottenuta utilizzando il valore di cut-off epidemiologico (ECOFF) definito dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: ampicillina, cefotaxime, sulfametossazolo, tetraciclina, stremptomicina, apramicina e florfenicolo. Per gli antibiotici non inclusi nel panel dell'EUCAST i seguenti valori sono stati utilizzati come cutt-off: >16 e ≥32 mg/L rispettivamente per stremptomicina e apramicina.

Sono stati inoltre valutati i diversi profili di multi resistenti dei ceppi (MDR) e la loro distribuzione di frequenza nelle diverse categorie produttive, definendo come ceppo MRD un ceppo resistente a tre o più classi antibiotiche diverse.

Analisi statistica

I dati relativi alla determinazione della MIC sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva al fine di rilevare e monitorare eventuali cambiamenti nei livelli di sensibilità agli antibiotici. Il test Linear-by-Linear (EFSA, 2017) è stato utilizzato per verificare l'esistenza di cambiamenti dei livelli di resistenza nel corso delle tre visite in azienda.

Per le diverse categorie produttive, le frequenze di *E.* coli resistenti alle molecole testate sono state comparate usando il test chi quadrato.

I dati sono stati inoltre analizzati anche al fine di valutare la distribuzione di frequenza di isolati multi-resistenti, focalizzando l'attenzione sugli isolati con un numero di resistenze ≥ 3 classi antibiotiche diverse. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata impostata a valori di $p < 0,05$.

RISULTATI

In totale sono stati testati 159 isolati di *E.* coli, recuperati dal terreno ChromAgar ECC. In tabella 1 vengono riportate le percentuali dei ceppi resistenti alle molecole testate e le significatività relative alla diminuzione delle resistenze osservate nel corso dello studio longitudinale.

Complessivamente, 108 (67,92%) dei 159 dei *E.* coli indicatori è risultato resistente ad almeno un antibiotico. Le più alte percentuali di resistenza sono state osservati, rispettivamente, per: tetraciclina (54,7%), ampicillina (33,3%), sulfametossazolo (29,5%) e streptomicina (18,2%). Percentuali inferiori di ceppi resistenti sono state riscontrate per florfenicolo (8,8%) e ciprofloxacina (1,8%). Tutti gli isolati esaminati erano sensibili alle cefalosporine di terza generazione (cefotaxima).

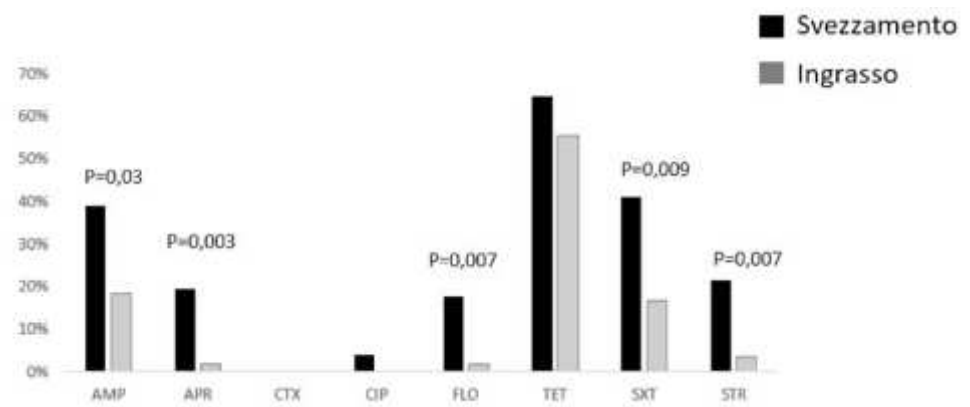
Le resistenze nei confronti delle molecole testate sono diminuite significativamente nel tempo del 23,3% per ampicillina ($p=0,01$) e del 26,5% sulfametossazolo ($p=0,003$). Una tendenza alla riduzione nel tempo delle percentuali di *E.* coli indicatori resistenti, è stata osservata anche per gli aminoglicosidi, l'apramicina ($p=0,06$) e la streptomicina ($p=0,057$).

Nella figura 1 viene riportata la distribuzione percentuale (e i relativi valori di significatività statistica) dei ceppi di *E.* coli indicatori resistenti alle molecole testate nelle diverse categorie produttive e raggruppando le tre visite effettuate in azienda. I ceppi isolati da suini in fase svezzamento presentano percentuali di resistenza più elevate nei confronti di tutti gli antibiotici testati rispetto agli animali all'ingrasso.

Tabella 1: Frequenza assoluta e percentuale di ceppi antibiotico resistenti di *E.* coli isolati da pool di feci di suini raccolti durante le tre visite in azienda. *,** indicano rispettivamente un p-value <0,05 e <0,001. I criteri di interpretazione per i valori di MIC sono indicati in mg/L.
Table 1*: Frequency and percentage of resistant E. coli strains isolated from pool of pig faeces, collected during the three farm visits. *, ** indicate respectively p-value <0.05 and <0.001. MIC values are reported in mg / L*

Molecola	Cut-off MIC	Numero di ceppi antibiotico resistenti di *E.* coli per ciascun prelievo (%)							
		T1 (51)		T2 (54)		T3 (54)		totale	
AMP *	>8	26	(50,9%)	12	(22,2%)	15	(27,7%)	53	(33,3%)
APR	≥32	10	(19,6%)	7	(12,9%)	4	(7,4%)	21	(13,2%)
CIP	>0,064	1	(1,9%)	2	(3,7%)	0	(0%)	3	(1,8%)
FLO	>16	4	(7,8%)	5	(9,2%)	5	(9,2%)	14	(8,8%)
TET	>8	35	(68,6%)	23	(42,5%)	29	(53,7%)	87	(54,7%)
SXT **	>1	23	(45,0%)	14	(25,9%)	10	(18,5%)	47	(29,5%)
STR	>16	14	(27,4%)	8	(14,8%)	7	(12,9%)	29	(18,2%)
CTX	>0,25	0	-	0	-	0	-	0	-

Figura 1: Percentuali di resistenza agli antibiotici di ceppi di *E.* coli isolati da pool di feci di suini in svezzamento e suini all'ingrasso.
Figure 1: *Percentage of resistant E. coli strains isolated from weaner and finisher pooled faeces samples.*



I profili di multi resistenza e la loro distribuzione nelle varie classi di età sono riportati, rispettivamente, nelle tabelle 3 e 4. Complessivamente, Il 28,9% dei ceppi di *E. coli* è risultato essere MDR.
Confrontando la distribuzione dei ceppi MDR nelle diverse classi d'età, è evidente che gli animali all'ingrasso presentano una frequenza di isolati MDR inferiore rispetto alle classi precedenti (p<0,01). AMP/SXT/TET/AMINO è risultato il profilo di MDR maggiormente osservato nel 32,6% (15 su 46) di tutti i ceppi di *E.* coli MDR.

Tabella 3: Percentuale di ceppi di *E.* coli multi resistenti nelle diverse categorie produttive.
Table 3: *Percentage of multi-resistant E. coli strains isolated from the different age classes.*

Classe di MDR	*E. coli* indicatori		
	Svezzamento (n=51)	Magronaggio (n=54)	Ingrasso (n=54)
6	3,9%	0,0%	0,0%
5	3,9%	3,7%	0,0%
4	17,6%	16,7%	13,3%
3	19,6%	9,3%	3,3%
Totale	45,1%	29,6%	13,0%

Tabella 4: Profili di multi resistenza osservati in *E.* coli multi resistenti.
Table 4: *Pattern of multi-resistance E. coli isolated.*

Profili di MDR	Numero e percentuale di ceppi di *E. coli* MDR (n=46)	
AMP/SXT/CIP/FLO/TET/AMINO	2	4,3%
AMP/SXT/FLO/TET/AMINO	3	6,5%
AMP/SXT/CIP/FLO/AMINO	1	2,2%
AMP/SXT/TET/AMINO	**15**	**32,6%**
AMP/FLO/TET/AMINO	1	2,2%
AMP/SXT/FLO/AMINO	0	0,0%
AMP/SXT/FLO/TET	4	8,7%
AMP/SXT/CIP/TET	0	0,0%
AMP/CIP/TET/AMINO	0	0,0%
AMP/SXT/TET	7	15,2%
AMP/SXT/AMINO	2	4,3%
AMP/TET/AMINO	5	10,9%
SXT/TET/AMINO	3	6,5%
AMP/FLO/TET	3	6,5%

DISCUSSIONE

Come ampiamente prevedibile in base ad osservazioni precedenti, un'elevata percentuale dei ceppi di *E. coli* è risultata resistente alle tetracicline, sulfametossazolo, ampicillina e aminoglicosidi (tabella 1). L'uso estensivo di questi antimicrobici nell'industria suinicola nel corso di molti anni ha favorito l'insorgenza di fenomeni di resistenza nei confronti di questi farmaci (EFSA, 2017). Uno studio precedente ha infatti evidenziato nei suini una più alta probabilità di ospitare *E.* coli resistenti a questi antibiotici rispetto alle altre specie di interesse zootecnico (Sayah et al., 2005).

Una percentuale molto inferiore di isolati (inferiore al 10%) è risultata essere resistente al florfenicolo. Il florfenicolo, introdotto in medicina veterinaria solo 20 anni fa, è considerato un nuovo agente antimicrobico, quindi le popolazioni animali non hanno una lunga storia di esposizione a questo farmaco se comparate all'esposizione ad altre molecole come tetracicline (introdotte nel 1948) o ampicillina (introdotta nel 1961) (Blickwede and Schwarz, 2004). Molti autori sostengono infatti che le resistenze al florfenicolo siano da attribuirsi a meccanismi di co-selezione (Blickwede and Schwarz, 2004; Rosengren et al., 2007) che si verificano quando i geni che codificano per fenotipi resistenti si trovano insieme sullo stesso elemento genetico sia esso un plasmide, un trasposone o un integrone (Chapman, 2003) piuttosto che a seguito dell'utilizzo diretto di tale molecola.

In questo studio poca o nessuna resistenza è stata riscontrata nei confronti dei *critically important antimicrobials* (CIA): cefalosporine di terza generazione (cefotaxime) e fluorochinolone (ciprofloxacina). Gli antibiotici identificati come CIA sono di particolare importanza per la salute umana, poichè il loro utilizzo è ancora efficace per contrastare alcune importanti infezioni batteriche nell'uomo. Per questa ragione, la potenziale o reale resistenza a queste molecole rimane una fonte di grande preoccupazione. Questi antimicrobici devono essere monitorati e il loro utilizzo limitato ai soli casi in cui non esistano alternative disponibili. Pertanto, il fatto che nel presente studio sono state riscontrati bassi livelli di resistenze nei confronti di questi antibiotici è senza dubbio un risultato rassicurante dal punto di vista della salute umana (WHO, 2017).

È ormai assodato che esiste una associazione tra l'esposizione agli agenti antimicrobici e la selezione di batteri resistenti; meno chiaro è se, o in che misura, la riduzione dell'uso di antimicrobici possa invertire il processo e ripristinare la sensibilità di una popolazione batterica resistente.

I risultati del presente studio sembrano indicare che la sospensione dell'uso di antibiotici per un periodo pari a circa un anno ha portato ad una diminuzione delle resistenze seppur in misura diversa a seconda delle molecole testate.

I livelli di resistenza dei *E.* coli indicatori sono diminuiti significativamente nel tempo per ampicillina e trimetoprim+sulfadiazina. ($p<0,05$). Una riduzione nel numero di *E.* coli indicatori resistenti è stato osservato anche nei confronti degli aminoglicosidi (apramicina e streptomicina) seppur non a livelli significativi.

Tuttavia, nonostante l'assenza della pressione selettiva esercitata dagli antibiotici, per alcune molecole (es. tetracicline), le percentuali dei ceppi resistenti si sono mantenute elevate e stabili per tutta la durata dello studio, mostrando pienamente la complessità di questo fenomeno dovuto alla potenzialità di diffusione e mantenimento delle resistenze agli antibiotici. Diversi fattori possono spiegare la mancanza del declino di ceppi antibiotico-resistenti. In primo luogo, potrebbe trattarsi una questione temporale e il declino potrebbe non essersi ancora verificato nel corso degli 11 mesi di durata di questo studio. In secondo luogo, studi precedenti hanno dimostrato l'esistenza di mutazioni compensatorie in grado di minimizzare il costo di fitness che comporta l'acquisizione di resistenza, sia mediata da plasmidi o mutazionale, consentendo così a ceppi resistenti di persistere anche in

assenza di selezione (Enne et al., 2001; Schrag et al., 1997). In terzo luogo, l'ambiente dell'allevamento potrebbe fungere da serbatoio delle resistenze e mantenerle anche a seguito di una riduzione di utilizzo dei farmaci negli animali (McEwen and Fedorka-Cray, 2002). Infatti, una volta presenti in azienda, i batteri resistenti agli antimicrobici possono essere isolati ripetutamente da lotti successivi di animali, anche a fronte di frequenti cicli di pulizia e disinfezione e poca pressione di selezione (Mo, 2016).

Le differenze in termini di resistenze riscontrate nelle diverse categorie produttive potrebbero essere imputabili proprio alle nicchie ecologiche ambientali e alla loro potenzialità di rappresentare dei *reservoir* di geni di resistenza (McEwen and Fedorka-Cray, 2002).

Nei campioni provenienti da animali in fase di svezzamento, stabulati in box nei quali, in passato, sono stati allevati animali che hanno subito dei trattamenti con antibiotici, sono state riscontrate percentuali di resistenza più elevate alle molecole testate e una maggiore frequenza di ceppi MDR. Al contrario, la percentuale di ceppi resistenti e MDR isolati dagli animali all'ingrasso (stabulati in box in cui non sono mai stati allevati animali sui quali sono stati effettuati trattamenti antibiotici di massa) era generalmente inferiore rispetto alle classi di età precedenti (figura 1 e tabella 3).

Infine, dallo studio dei profili di multi resistenza è emerso che le stesse molecole per le quali è stata osservata una maggiore resistenza tra i ceppi di *E.* coli (tetracicline, sulfametossazolo, ampicillina e aminoglicosidi) sono risultate essere componenti del profilo di multi-resistenza maggiormente osservato (tabella 4). Questo osservazione conferma la necessità di porre l'attenzione sull'ipotesi che i geni di resistenza alle suddette molecole potrebbero essere veicolati dai medesimi plasmidi con conseguente co-selezione (EFSA, 2017).

BIBLIOGRAFIA

1. Blickwede, M., & Schwarz, S. (2004). Molecular analysis of florfenicol-resistant Escherichia coli isolates from pigs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 53*(1), 58-64.
2. Chapman, J. S. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *International biodeterioration & biodegradation, 51*(4), 271-276.
3. EFSA. (2017). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2015. *EFSA Journal, 15*(2), e04694.
4. Enne, V. I., Livermore, D. M., Stephens, P., & Hall, L. M. (2001). Persistence of sulphonamide resistance in Escherichia coli in the UK despite national prescribing restriction. *The lancet, 357*(9265), 1325-1328.
5. Lowy, F. D. (2003). Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. *The Journal of clinical investigation, 111*(9), 1265-1273.
6. McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clinical Infectious Diseases, 34*(Supplement_3), S93-S106.
7. Mo, S. S. (2016). Cephalosporin-resistant escherichia coli in the Norwegian broiler production pyramid: genetic characterization and determination of risk factors.
8. Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology spectrum, 4*(2).
9. Österberg, J., Wingstrand, A., Jensen, A. N., Kerouanton, A., Cibin, V., Barco, L., . . Bengtsson, B. (2016). Antibiotic resistance in Escherichia coli from pigs in organic and conventional farming in four European countries. *PloS one, 11*(6), e0157049.
10. Rosengren, L. B., Waldner, C. L., Reid-Smith, R. J., Dowling, P. M., & Harding, J.

C. (2007). Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal Escherichia coli from grow-finish pigs. *Microbial Drug Resistance, 13*(4), 261-270.
11. Sayah, R. S., Kaneene, J. B., Johnson, Y., & Miller, R. (2005). Patterns of antimicrobial resistance observed in Escherichia coli isolates obtained from domestic-and wild-animal fecal samples, human septage, and surface water. *Applied and environmental microbiology, 71*(3), 1394-1404.
12. Schrag, S. J., Perrot, V., & Levin, B. R. (1997). Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in Escherichia coli. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 264*(1386), 1287-1291.
13. WHO. (2017). *The selection and use of essential medicines: report of the WHO Expert Committee, 2017 (including the 20th WHO Model List of Essential Medicines and the 6th Model List of Essential Medicines for Children)*: World Health Organization.

ACIDO LAURICO SAPONIFICATO CON IL CALCIO NELLA DIETA DI SUINETTI IN POST SVEZZAMENTO: EFFETTI SULLE PERFORMANCE DI CRESCITA E SULLA SALUTE INTESTINALE

LAURIC ACID SAPONIFIED WITH CALCIUM IN POST WEANING PIGLETS: EFFECT ON GROWTH PERFORMANCE AND GUT HEALTH

GIORGI S., COMI M., GHIRINGHELLI M., CEVOLANI D., BONTEMPO V.

Università degli Studi di Milano – Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare

Parole chiave: acidi grassi a media catena, acido laurico, saponificazione
Key words: medium chain fatty acids, lauric acid, saponification

Riassunto: È noto che gli acidi grassi a media catena (MCFA) hanno un'azione antibatterica, in particolare nei confronti dei batteri Gram+. Lo scopo del lavoro è stato valutare gli effetti dell'acido laurico (C12) saponificato con il calcio sulle performance produttive e la salute intestinale dei suinetti in svezzamento. Per la prova sono stati impiegati 192 suinetti, ripartiti in 3 gruppi, alimentati rispettivamente con una dieta basale (Db= Ctr), Db+Amoxicillina, 400mg/kg (T1) e Db+C12-Ca, 1kg/ton (T2). L'integrazione della dieta con C12-Ca ha comportato una riduzione della mortalità e dei trattamenti medicamentosi rispetto ai soggetti Ctr. L'efficienza alimentare è risultata analoga nei soggetti alimentati con la dieta integrata con laurato di calcio e in quelli trattati con antibiotico, con una differenza significativa rispetto ai controlli (P<0,05). La somministrazione del laurato ha infine determinato un miglioramento dello stato antiossidante della mucosa intestinale rispetto ai soggetti degli altri due gruppi con un aumento della capacità antiossidante totale TAOC (P <0,01) e una riduzione dei livelli di Malondialdeide (P<0,01). I risultati suggeriscono che l'inclusione nella dieta dei suinetti di C12-Ca può migliorare la salute intestinale e può rappresentare una possibile alternativa all'antibiotico, impiegato per scopi di profilassi.

Abstract: It is known that medium chain fatty acids (MCFA) have antibacterial action, in particular against Gram + bacteria. The aim of the present work was to evaluate the effects of lauric acid (C12) saponified with calcium on growth performance and gut health of weaned piglets. 192 piglets were used, divided into 3 groups, fed respectively with a basal diet (Db = Ctr), Db + Amoxicillin, 400mg / kg (T1) and Db + C12-Ca, 1kg / ton (T2). The diet integration with C12-Ca led to a reduction in mortality and antibiotic treatments compared to Ctr. Feed efficiency was similar in piglets fed with the diet supplemented with calcium laurate and those treated with antibiotic, with a significant difference compared to Ctr (P<0,05). Finally, administration of laurate has led to an improvement in the antioxidant state of intestinal mucosa compared to piglets of other two groups with an increase in total antioxidant TAOC (P <0,01) and a reduction of Malondialdehyde levels (P <0,01). The results suggest that the inclusion in piglet diet of C12-Ca can improve gut health and may represent a possible alternative to antibiotic used for prophylaxis purposes.

INTRODUZIONE

Il crescente problema dell'antibiotico resistenza ha imposto l'esigenza di valutare strategie

nutrizionali alternative che limitino l'uso dell'antibiotico nell'allevamento suino. Una possibile soluzione è rappresentata dagli acidi grassi a media catena (MCFA). Precedenti studi hanno dimostrato come gli MCFA migliorino le prestazioni di crescita e prevengano gli effetti negativi associati allo svezzamento dei suinetti [1]. Gli MCFA possono essere utilizzati direttamente dagli enterociti per produrre energia e aiutare a sostenere l'integrità della parete intestinale. In aggiunta, gli MCFA vengono assorbiti in modo più efficiente rispetto ad altri acidi grassi lungo il tratto gastrointestinale; i suini possono assorbirli parzialmente già nello stomaco [2]. In seguito, gli MCFA subiscono una semplice degradazione in acidi grassi e glicerolo, dopodiché raggiungono il fegato attraverso la circolazione portale dove vengono rapidamente ossidati [3]. Studi microbiologici hanno evidenziato anche come gli MCFA, in particolare l'acido laurico, mostrino una maggiore efficacia contro i batteri Gram + (i.e. *Streptococcus Suis*) [4, 5]. L'obiettivo primario del meccanismo antimicrobico degli MCFA è il danneggiamento della membrana cellulare batterica. Il comportamento *membrano-litico* degli MCFA deriva dalle loro proprietà anfipatiche, che permettono a queste molecole di aderire alla membrana cellulare, causandone la destabilizzazione e la formazione di pori. L'attività destabilizzante della membrana provoca un aumento della permeabilità cellulare e della lisi, portando all'inibizione della crescita delle cellule batteriche o direttamente alla morte. Gli MCFA possono anche alterare i processi vitali delle cellule, tra cui la catena di trasporto degli elettroni e la fosforilazione ossidativa, essenziali per la produzione di energia [6,7]. In questo contesto, l'acido laurico potrebbe rappresentare una valida alternativa nella prevenzione delle infezioni da streptococchi nel post-svezzamento dei suini. Tuttavia, somministrato in forma libera, l'acido laurico viene rapidamente assorbito dalle cellule della mucosa intestinale, riducendone o vanificandone gli effetti. Per ovviare a questa problematica, viene utilizzato nella sua forma esterificata con il glicerolo; in questo modo è possibile ritardarne l'assorbimento nello stomaco e nella parte iniziale dell'intestino, in modo da prolungarne l'efficacia lungo il tratto gastrointestinale [8].

Tuttavia, l'esterificazione presenta alcuni svantaggi: il prodotto ottenuto è una sostanza simile a un gel, la cui consistenza rende difficoltoso il suo inserimento nei mangimi. Inoltre, considerando che l'effetto antibatterico dell'acido grasso, dipende anche dal dosaggio, e quindi dalla quantità di principio attivo presente nel lume intestinale, l'esterificazione può rappresentare un limite al suo utilizzo. Infatti, il processo di esterificazione necessita dell'aggiunta di una base inorganica (solitamente silice) che ne modifichi la consistenza, ottenendo un prodotto granulare e più semplice da miscelare. Tuttavia, l'aggiunta di basi inorganiche porta ad una riduzione della quantità di acido grasso nel prodotto finale (anche del 40%) poiché la base occupa molto spazio nella molecola. Ciò comporta un aumento del dosaggio, potenzialmente svantaggioso sia in termini economici sia per la salute dei suinetti. Per ovviare a queste problematiche, una soluzione innovativa può essere rappresentata dalla saponificazione, un processo che consiste nel saponificare gli MCFA, aggiungendo idrossido di calcio o altri elementi, per ottenere i sali degli acidi grassi (saponi), facilmente includibili nei mangimi [9, 10]. La saponificazione può inoltre essere un metodo efficace per introdurre una più alta concentrazione di MCFA *in situ*: nel prodotto finito, solo circa il 7-10% è occupato dall'elemento. In particolare, l'acido laurico saponificato con il calcio è composto da acido laurico (75%) e una matrice protettiva di sapone di calcio che all'interno dell'apparato gastrointestinale riesce a bypassare lo stomaco e a raggiungere l'intestino dove viene sottoposto a idrolisi e l'acido laurico, in forma libera, può così esplicare le proprie funzioni lungo l'intero apparato digestivo. Poiché attualmente, non vi sono studi pubblicati su come il laurato di calcio influenzi la salute intestinale e le prestazioni di crescita dei suinetti, questo lavoro mira a testarne l'efficacia.

MATERIALI E METODI

Animali e Management

Lo studio è stato condotto presso il Centro Zootecnico Didattico Sperimentale (CZDS) dell'Università degli Studi di Milano (Lodi, Italia), su un totale di 192 suinetti svezzati (24 d) Topigs [Stambo HBI x Dalland 40, peso medio di 9,33 ± Gli animali sono stati alloggiati in due sale post-svezzamento con 24 gabbiette ciascuna, ognuna in grado di accogliere 4 soggetti. Nelle due sale venivano garantite le medesime condizioni microclimatiche. I suinetti sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali con 16 repliche (gabbiette, unità sperimentale). La dieta basale, somministrata sotto forma di farina, era una tipica dieta commerciale per il post-svezzamento, differenziata in Pre-starter e Starter. I trattamenti dietetici sono stati i seguenti:

- Dieta basale, Db (CTR) nessun supplemento;
- Db + Amoxicillina 400 mg/kg (T1);
- Db + C12-Ca 1 kg/ton (T2).

Campionamento e Analisi

Nel corso della prova, i suinetti sono stati pesati a 0, 14 e 28 d. È stata inoltre calcolata l'assunzione di alimento giornaliera per gabbietta. Allo svezzamento, al cambio di dieta (14 d) e alla fine dello studio è stato prelevato direttamente dall'ampolla rettale di un suinetto per replica, un campione di feci per le analisi a parametri antinfiammatori (IL-6 e IL-10) e immunitari (IgG specifiche per Streptococcus Suis e IgA). Al termine dello studio, sei suinetti per gruppo sono stati macellati per il prelievo di campioni di mucosa intestinale di duodeno, digiuno e cieco, al fine della valutazione dello stato antiossidante, tramite l'analisi della capacità antiossidante totale (TAOC) e della Malondialdeide (MDA). La mortalità e gli eventuali trattamenti medicamentosi sono stati registrati giornalmente.

Analisi statistica

I dati relativi alla performance di crescita sono stati analizzati mediante la procedura MIXED di SAS v. 9.1 (SAS Institute, 2008) e sono presentati come media dei minimi quadrati per periodi e per la prova completa ± SEM. I dati relativi allo stato antiossidante e ai parametri infiammatori e immunitari sono stati analizzati mediante Kruskal-Wallis test e Post Hoc test (SPSS) e sono presentati come la media dei minimi quadrati ± DS.

RISULTATI

La Tabella 1 riassume i dati relativi la crescita dei suinetti: nessuna differenza significativa è stata osservata per il peso e l'assunzione di alimento mentre per quanto riguarda l'incremento ponderale giornaliero, considerando l'intero periodo della prova, il gruppo T1 ha registrato performance migliori rispetto al Controllo. Considerando invece, l'efficienza alimentare, nel periodo compreso tra 0 e 14 giorni e per l'intera durata della prova, l'integrazione con C12-Ca ha registrato valori inferiori rispetto al gruppo trattato con antibiotico ($P < 0,01$). Al contrario, nel periodo da 15 a 28 giorni, i dati mostrano come la somministrazione di C12-Ca abbia effetti sull'efficienza alimentare paragonabili a quelli dell'antibiotico ($P < 0,05$).

Tabella 1. Effetto dell'Acido Laurico saponificato con il calcio sulle performance di crescita.
Table 1. *Effects of Lauric Acid saponified with calcium on growth performance.*

	Trattamento				*P-value*		
Performance di crescita	**CTR**	**T1**	**T2**	**SEM**	**Trat.**	**Tempo**	**Trat.*Tempo**
Peso vivo, kg							
0 d	9,32	9,33	9,33	335,87	0,0068	<0,0001	0,1976
14 d	13,91	14,90	14,16				
28 d	22,02	23,67	22,76				
Incremento ponderale, g/d							
0-14 d	336	398	345	173,071	0,0053	0,0001	0,4564
15-28 d	572	626	614				
0-28 d	453^{B}	512^{A}	480	14,773	0,0596		
Assunzione alimentare, g/d							
0-14 d	511	543	535	309,118	0,474	<0,0001	0,9882
15-28 d	964	1.006	994				
0-28 d	737	774	765	39,474	0,6296		
Efficienza alimentare, g/d							
0-14 d	0,64^{B}	0,73^{A}	0,65^{B}	0,01356	<0,0001	<0,0001	0,0226
15-28 d	0,57^{a}	0,62^{b}	0,62^{b}				
0-28 d	0,60^{Aa}	0,66^{B}	0,63^{Ab}	0,01218	<0,0001		

^{A,B}= P<0,01. ^{a,b}= P<0,05. I dati sono presentati come media ± SEM.
^{A,B}= P<0,01. ^{a,b}= P<0,05. The data are presented as least squared mean ± SEM.

Per quanto riguarda la mortalità, dalla Tabella 2 si evince come per il trattamento con amoxicillina non sia stata registrata alcuna mortalità. Tuttavia, è possibile evidenziare che il trattamento con acido laurico abbia avuto comunque una mortalità inferiore (più del 50%) rispetto ai soggetti del gruppo di controllo. Dalla stessa Tabella si vede come gli animali sottoposti a trattamenti medicamentosi siano in totale 18, di cui 8 per *Streptococcus suis* e 10 per diarrea. Si deve sottolineare il fatto che i 3 suinetti trattati del gruppo T2 non sono gli stessi animali la cui morte è stata registrata e che sono poi completamente guariti.

Tabella 2. Animali morti e trattati durante la prova.
Table 2. *Animals dead and treated on running trial.*

	CTR	**T1**	**T2**	**Total**
Morti	7	0	3	10
Trattati con antibiotico				
- *Streptococcus suis* (Amoxycillin 2ml x 3d)	5	0	3	18
- Diarrea (Enrofloxacin)	1	9	0	

I risultati inerenti all'attività antinfiammatoria e immunomodulatoria di C12-Ca sono presentati in Tabella 3. Dalle analisi effettuate sulle feci non sono state riscontrate differenze significative, né per quanto riguarda IgA, né per quanto riguarda IL-6 e IL-10 in tutti e tre i gruppi. L'analisi quantitativa delle IgG specifiche per *Streptococcus suis* nelle feci è risultata negativa per tutti i campioni analizzati.

Tabella 3. Effetto dell'Acido Laurico saponificato con il calcio sui parametri immunitari (IgG, IgA) e infiammatori (IL-10, IL-6) nelle feci.
Table 3. *Effect of Lauric acid saponified with calcium on IL-6, IL-10, IgA and IgG specific for Streptococcus suis in feces.*

	Trattamento			
Parametri	**CTR**	**T1**	**T2**	**P- value**
0 d				
IgA (µg/g)	41,24	34,89	32,77	0,5993
IL-10 (pg/g)	0,890	0,890	0,890	1
IL-6 (pg/g)	7,92	6,35	6,40	0,6678
IgG *S. suis*	Negativo	Negativo	Negativo	
14 d				
IgA (µg/g)	1,64	1,51	1,51	0,658
IL-10 (pg/g)	0,90	0,94	0,89	0,595
IL-6 (pg/g)	2,65	2,62	2,60	0,484
IgG *S. suis*	Negativo	Negativo	Negativo	
28 d				
IgA (µg/g)	1,540,77	1,490,75	1,551	0,335
IL-10 (pg/g)	0,890	0,890	0,890	1
IL-6 (pg/g)	2,441,85	2,441,89	2,522,31	0,879
IgG *S. suis*	Negativo	Negativo	Negativo	

IL, interleuchine; Ig, immunoglobuline. I dati sono presentati come media ± DS.
IL, interleukin; Ig, immunoglobulins. The data are presented as least squared mean ± DS.

I risultati dei parametri antiossidanti sulla mucosa intestinale di duodeno, digiuno e cielo riportati in Tabella 4, mostrano come il trattamento con laurato di calcio abbia registrato un aumento significativo di TAOC rispetto agli altri due gruppi, in tutti i distretti intestinali (P <0,01). Per quanto riguarda il livello di MDA, gli animali alimentati con la dieta addizionata con laurato di calcio hanno registrato livelli di MDA significativamente più bassi rispetto al gruppo trattato con Amoxicillina e al controllo (P <0,01).

Tabella 4. Effetto dell'Acido Laurico saponificato con il calcio sulla capacità antiossidante totale (TAOC) e sulla Malondialdeide (MDA) della mucosa intestinale.
Table 4. *Effect of Lauric acid saponified with calcium on Total Antioxidant Capacity (TAOC) and Malondialdeide (MDA) on intestinal mucosa.*

		Trattamento			
Tessuto intestinale		**CTR**	**T1**	**T2**	**P- value**
Duodeno					
	MDA (nmoli/mg)	2.53^{A}	2.08^{B}	1.86^{B}	0,0001
	TAOC (nmoli/µl TROLOX eq.)	4.27^{A}	4.50^{A}	5.13^{B}	0,0001
Ileo					
	MDA (nmoli/mg)	$2,510,19^{A}$	$2,130,24^{B}$	$1,880,25^{B}$	0,0001
	TAOC (nmoli/µl TROLOX eq.)	$5,990,29^{A}$	$6,210,26^{A}$	$6,930,34^{B}$	0,0001
Cieco					
	MDA (nmoli/mg)	$2,510,20^{A}$	$2,100,23^{B}$	$1,960,33^{B}$	0,0001
	TAOC (nmoli/µl TROLOX eq.)	$6,230,16^{A}$	$6,590,33^{B}$	$7,070,38^{C}$	0,0001

^{A,B}= P<0,01. I dati sono presentati come media ± DS.
^{A,B}= P<0,01. The data are presented as least squared mean ± DS.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati relativi alle performance di crescita dei suinetti sono comparabili ai risultati ottenuti in altri studi effettuati su suinetti alimentati con acidi grassi esterificati [11]. Per quanto riguarda i risultati migliori evidenziati sull'efficienza alimentare all'inizio della prova e in generale, nel gruppo alimentato con Amoxicillina, possono considerarsi risultati attesi, in quanto l'antibiotico ha una comprovata e più rapida efficacia sulla salute dei suinetti rispetto. Tuttavia, se si prende in considerazione il periodo dalla seconda settimana alla fine dello studio, i risultati ottenuti nel gruppo trattato con laurato, sono comparabili a quelli del gruppo trattato con Amoxicillina. Questo indica come l'acido laurico saponificato con il calcio, sebbene necessiti di un lasso di tempo maggiore per esplicare le proprie funzioni sulla crescita e la salute dei suinetti, abbia un'azione paragonabile a quella dell'antibiotico.

L'attività antibatterica degli MCFA è ben nota; in letteratura, è riportato come gli MCFA siano particolarmente efficaci contro i batteri Gram +, in particolare, l'acido laurico ha una notevole azione battericida contro gli streptococchi [4]. La streptococcosi è una patologia che causa significative perdite economiche nell'industria suinicola [12, 13]. È noto che la principale via di infezione sia il sistema respiratorio: *Streptococco suis* viene trasferito dalla secrezione vaginale della scrofa alla cavità orale-nasale dei suinetti durante il parto e colonizza le tonsille immediatamente dopo la nascita [14]. La patologia è tuttavia difficilmente visibile fino a 15 giorni dopo lo svezzamento, in quanto, gli animali sono inizialmente protetti dall'immunità materna. Secondo Segura et al. (2016) [14], l'apparato gastrointestinale non può essere escluso come sito secondario di infezione. In letteratura è riportato come dopo lo svezzamento la concentrazione intestinale di *Streptococcus suis* aumenti o rimanga costante, ma presente, e che lo stress causato dallo svezzamento, riducendo le difese immunitarie, permetta al batterio di esplicare la sua patogenicità. Combinando questi dati con la mancanza di episodi diarroici, la mortalità per *Streptococcus suis* ridotta e la completa ripresa degli animali affetti nel gruppo con laurato di calcio, possiamo ipotizzare un'azione generale sulla salute dei suinetti, quanto meno sulla salute intestinale, e nei confronti della diarrea da svezzamento.

Per quanto riguarda l'effetto di C12-Ca sullo stato infiammatorio e immunitario intestinale dei suinetti, le analisi sulle feci non hanno evidenziato dati significativi. Al contrario, l'analisi riguardante lo stato antiossidante della mucosa intestinale ha mostrato dati interessanti. È risaputo come i suinetti svezzati siano facilmente soggetti a squilibri dello stato antiossidante intestinale [15]; nel presente studio, i livelli di TAOC, i quali riflettono il sistema di difesa antiossidante non enzimatico dell'organismo [16], sono significativamente più alti negli animali trattati con C12-Ca. Al contrario, i livelli di MDA (marker di perossidazione lipidica) sono inferiori. Ciò indica che l'integrazione con laurato di calcio ha svolto un ruolo nella prevenzione della perossidazione e dell'ossidazione dei lipidi endogeni, promuovendo la salute intestinale. Questo risultato può essere considerato un indicatore indiretto dello stato infiammatorio. Studi in umana hanno dimostrato come l'infiammazione e l'ossidazione siano correlate [17]. Una di esse può apparire prima o dopo l'altra, ma quando una di esse appare, l'altra è più probabile che sia presente; poi entrambe partecipano alla patogenesi di molte malattie croniche [18, 19]. Questi risultati mostrano uno stato antiossidante intestinale positivo negli animali a cui è stato somministrato C12-Ca, che rende ipotizzabile anche uno stato infiammatorio migliore.

Alla luce di questi risultati, è ipotizzabile un impiego del laurato di calcio per una parziale riduzione dell'antibiotico, sia in termini di dosaggio sia di durata del trattamento. L'acido laurico saponificato con il calcio non rappresenta un'alternativa all'antibiotico in quanto tale, ma se prendiamo in considerazione l'efficienza alimentare paragonabile nei due trattamenti, la minore mortalità rispetto al controllo e la più rapida ripresa degli animali affetti da *Streptococcus suis*, possiamo comunque affermare che potrebbe consentire la riduzione dell'antibiotico nei suinetti in svezzamento, migliorandone anche la salute intestinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Zentek J, Buchheit-Renko S., Ferrara F., Vahjen W., Van Kessel A.G., Pieper R. (2011). "Nutritional and physiological role of medium-chain triglycerides and medium-chain fatty acids in piglets". Anim. Health. Res. Rev. 12, 83–93.
2. Liu Y. (2015). "Fatty acids, inflammation and intestinal health in pigs. A review". J. Anim. Sci. Biotechnol. 41, 1-9.
3. Li Y., Zhang H., Yang L., Wang T. (2015). "Effect of medium-chain triglycerides on growth performance, nutrient digestibility, plasma metabolites and antioxidant capacity in weanling pigs ". J. Anim. Nutr. 1, 12–18.
4. Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrimsson O., Thormar H. (2001). "Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides". APMIS 109, 670-678.
5. Lieberman S., Enig M.G., Preuss H.G. (2006). "A Review of Monolaurin and Lauric Acid: Natural Virucidal and Bactericidal Agents". J. Altern. Complement. Med.12, 310-314.
6. Desbois A., Smith V. (2010). "Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential". Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 1629-1642.
7. Yoon B., Jackman J., Valle-González E., Cho N.J. (2018). **"**Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: biological activities, experimental testing, and therapeutic applications". Int. J. Mol. Sci. 19, 1114.
8. Dierick N.A., Decuypere J.A., Degeyter I. (2003). "The combined use of whole Cuphea seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition." Arch. Tierernahr. 57, 49-63.
9. Schumann K., Siekmann K. (2000). "Soaps" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim.
10. Cevolani D. (2016). Prontuario degli alimenti per il suino. 3a ed. Edagricole.

11. Zentek J., Buchheit-Renko S., Männer K., Pieper R., Vahjen W. (2012). "Intestinal concentrations of free and encapsulated dietary medium-chain fatty acids and effects on gastric microbial ecology and bacterial metabolic products in the digestive tract of piglets". Arch Anim Nutr. 66, 14–26.
12. Fittipaldi N., Segura M., Grenier D., Gottschalk M. (2012). "Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent Streptococcus suis". Future Microbiol. 7, 259-79.
13. Segura M., Fittipaldi N., Calzas C., Gottschalk M. (2017). "Critical Streptococcus suis virulence factors: are they all really critical?" Trends Microbiol. 7, 585- 599.
14. Segura M., Calzas C., Grenier D., Gottschalk M. (2016). "Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by Streptococcus suis: fighting against nonspecific defenses". FEBS Lett. 590, 3772-3799.
15. Xu J., Xu C., Chen X., Cai X., Yang S., Sheng Y., Wang T. (2014). "Regulation of an antioxidant blend on intestinal redox status and major microbiota in early weaned piglets". Nutrition. 30, 584–589.
16. Wang Y. Z., Xu C.L., An Z.H., Liu J.X., Feng J. (2008). "Effect of dietary bovine lactoferrin on performance and antioxidant status of piglets ". Anim. Feed Sci. Technol. 140, 326 – 336.
17. Castellani P., Balza E., Rubartelli A. (2014). "Inflammation, DAMPs, tumor development, and progression: a vicious circle orchestrated by redox signalling". Antioxid. Redox Signal. 7, 1086–1097.
18. Biswas S.K. (2016). "Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox?". Oxid. Med Cell. Longev. 1-9.
19. Cao S.T., Hang C.C., Wu H., Zhang Q.H., Jiao L.F., Hu C.H. (2018). "Weaning disrupts intestinal antioxidant status, impairs intestinal barrier and mitochondrial function, and triggers mitophagy in piglets". J. Anim. Sci. 96, 1073- 1083.

EFFETTI SULL'ACCRESCIMENTO LEGATI ALLA SOMMINISTRAZIONE DELLA PRIMA SOLUZIONE PROTEICA ISOTONICA IN SUINETTI NELLA SALA PARTO E NELLA FASE DI PASSAGGIO ALLO SVEZZAMENTO

EFFECTS ON GROWING RELATED TO THE ADMINISTRATION OF THE FIRST ISOTONIC PROTEIN SOLUTION IN PIGLETS IN THE FARROWING ROOM AND IN THE FIRST WEANING PERIOD

TAGLIAFERRI L.[1], COLZANI A.[2], SCOLLO A.[1], GRANATO L.[3], RIGHI F.[4], MAZZONI C.[1]

[1]Suivet, Via Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; [2]Add-CO Nutrition S.p.A; [3]Azienda Agricola La Fortezza, Via Rodello 31, 41043 Formigine (MO); [4]Dipartimento Scienze Medico Veterinarie-Università di Parma

Parole chiave: soluzione proteica isotonica, accrescimento
***Key words**: isotonic protein solution, growing*

RIASSUNTO: L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare l'efficacia di una bevanda proteica isotonica per suini e dei suoi effetti sulla salute intestinale. L'ampia capacità idratante e il contenuto di aminoacidi del prodotto hanno lo scopo di supportare la crescita e la salubrità degli enterociti, in modo da garantire un corretto assorbimento intestinale e quindi favorire la crescita dell'animale. È un prodotto consigliato soprattutto in sala parto già dal secondo giorno di vita poiché, essendo molto appetibile, i suinetti lo assumono fin da subito e può essere un valido aiuto in svezzamento dove, in particolare, è stato studiato per supportare il suinetto nella fase di transizione. Nello studio sono state coinvolte le nidiate di 8 scrofe per il gruppo controllo e 9 scrofe per il gruppo trattato. Le principali valutazioni sono state: 3 pesate individuali (2°, 22° e 34° giorno di vita), score fecale per nidiata in sala parto, score fecale sul singolo animale in svezzamento, consumo del prodotto o acqua per i rispettivi gruppi dal 2° al 8° giorno, mortalità e trattamenti. I risultati più interessanti sono emersi dai valori di accrescimento, infatti alla seconda e terza pesata (22° e 34° giorno di vita), i suinetti trattati sono risultati più pesanti dei controllo ($p<0,05$). Inoltre, a parità di mangime consumato dai due gruppi durante i primi dodici giorni post-svezzamento è emerso che il gruppo trattato ha un indice di conversione alimentare migliore rispetto al gruppo controllo.

ABSTRACT: The aim of this study was to evaluate the efficacy of a new isotonic solution and its effects on the intestinal health of the piglets. The moisturizing capacity and the amino acid content of the product are designed to support the growth and salubrity of the enterocytes in order to guarantee a correct intestinal absorption and therefore favor the growth of the animal. It is a recommended product especially in the farrowing room from the 2nd day of life since it's very palatable and it is particularly useful for supporting the transition phase to weaning. The study involved litters of 8 sows for the control group and 9 sows for the treated group. The main evaluations were: 3 weighs (2nd, 22nd and 34th day of life), fecal scores for litter in the farrowing room, individual fecal scores during weaning, consumption of the product and water from the 2nd to the 8th day of life, mortality and treatments. The most interesting results emerged from growing piglets, in fact at the 2nd and 3rd weight (22nd and 34th day of life respectively), the pigs were found to be heavier for the treated group than the control group ($p <0.05$). Furthermore, with the same feed consumed by the two groups during

the first twelve days post-weaning it was also possible to show that the treated group has a better food efficiency and a food conversion index compared to the control group.

INTRODUZIONE

La prima settimana di vita del suinetto rappresenta il momento cruciale per lo sviluppo di una mucosa intestinale sana e robusta. L'intestino del suino, a differenza di altri animali, cresce molto rapidamente nelle prime settimane dopo la nascita e le cellule principalmente deputate alla funzione di assorbimento, ossia gli enterociti, raddoppiano nei primi 10 giorni di vita (Smith et al., 1978). Per questi motivi è necessario fornire agli animali il substrato nutritizio ed energetico necessario a garantire un buon sviluppo dell'apparato enterico e il suo efficiente funzionamento. In commercio sono disponibili numerosi prodotti sotto forma di supplementi nutrizionali, reidratanti energetici ad alto contenuto di elettroliti o prodotti contenenti prebiotici o probiotici volti ad equilibrare la microflora intestinale specialmente in caso di disturbi della digestione dovuti all'alimentazione. Il prodotto oggetto dello studio è la prima bevanda proteica isotonica per suini presente in commercio, il meccanismo d'azione è volto a garantire una migliore idratazione e in particolare a fornire agli enterociti gli amminoacidi, i piccoli peptidi e gli zuccheri necessari per un corretto funzionamento e quindi un buon assorbimento delle sostanze nutritive (Firth et al., 2018). Gli elettroliti favoriscono l'infiltrazione di liquidi di reintegro attraverso la parete intestinale e quindi conseguentemente i tessuti riescono a conservare una tonicità ottimale con effetti positivi sulla vitalità dell'animale. Questa nuova formulazione ha come obiettivo il nutrimento diretto delle cellule intestinali in modo da garantirne una migliore efficienza; il prodotto inoltre, essendo isotonico, è velocemente assorbito dalla mucosa senza determinare perdite di acqua o sali e quindi può essere potenzialmente di aiuto per la gestione di animali malati, in particolare in caso di sintomatologia diarroica. La somministrazione del prodotto è consigliata soprattutto durante la lattazione, già dal 2° giorno di vita fino al 8°, periodo durante il quale l'ambiente intestinale del suinetto necessita di supporto essendo una fase piuttosto stressante e particolarmente soggetta all'insorgenza di diarree. È inoltre prevista la somministrazione durante la fase di transizione allo svezzamento ossia da circa 3 giorni prima dello svezzamento fino ai 3-5 giorni post-svezzamento per aiutare il suinetto ad adattarsi al meglio ai cambiamenti di alimentazione (Cortyl et al., 2018). Durante lo svezzamento infatti, l'intestino del suinetto subisce vari cambiamenti sia morfologici che biochimici che possono portare all'atrofia dei villi e all'iperplasia delle cripte, causando conseguentemente una diminuzione della capacità digestiva e dell'assorbimento e quindi una maggiore probabilità di insorgenza della diarrea post-svezzamento (Pluske et al., 1997).

Il prodotto risulta essere anche particolarmente appetibile quindi facilita l'assunzione di soluzioni orali amare.

Nel presente studio sono stati paragonati gli effetti della somministrazione di questa soluzione isotonica rispetto al semplice supplemento di acqua sia in sala parto che in svezzamento. In particolare si è posta l'attenzione su accrescimento ed indice di conversione alimentare, consumo del prodotto, incidenza e gravità delle diarree (tramite punteggi fecali), percentuale di mortalità e trattamenti.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in una scrofaia di circa 800 scrofe in banda bi-settimanale, ed ha coinvolto un totale di 17 nidiate di un'unica banda, nate alla fine di agosto 2018. L'azienda presenta genetica ANAS e una media di nati vivi di circa 12,8-13,1 con una percentuale di mortalità pre-svezzamento attorno al 10%. Per quanto riguarda lo stato sanitario aziendale è PRRS+, APP+, Rogna sarcoptica+ e i patogeni responsabili di diarree neonatali storicamente isolati sono *Clostridium perfringens* tipo A (α, β_2 tox), *Escherichia coli* (F18) e Rotavirus.

Nello studio sono state coinvolte le nidiate di 8 scrofe pluripare per il gruppo controllo e 9 scrofe

pluripare per il gruppo trattato omogenee per ordine di parto e performances riproduttive. Le scrofe di entrambi i gruppi erano posizionate in un'unica stanza contenente gabbie parto tutte uguali tra loro (metratura, pavimentazione, posizionamento lampade ecc). I parti delle scrofe sono stati indotti al 115° giorno per avere i parti al 116° in base alla lunghezza della gestazione stabilita dal programma di gestione dei dati aziendali. Le adozioni dei suinetti coinvolti nello studio sono state effettuate nell'arco delle prime 24 ore post-parto. In linea generale tutte le nidiate sono state pareggiate a 12/13 suinetti per scrofa, a parte le balie dei piccoli, una per il gruppo controllo e una per il gruppo trattato, che sono state pareggiate rispettivamente a 12 e 14 suinetti.

Al 2° giorno di vita tutti i suinetti delle covate di entrambi i gruppi sono stati identificati singolarmente mediante l'apposizione di marche auricolari numerate e pesati singolarmente. Dal 2° giorno al 8° giorno di vita il gruppo trattato ha assunto il prodotto al 3% in quantità di 500ml/covata/giorno in mangiatoie aperte mentre il gruppo controllo ha ricevuto un supplemento di acqua in pari quantità/nidiata/giorno. Per entrambi i gruppi era a disposizione acqua ad libitum tramite la presenza di abbeveratoi a spillo il cui funzionamento era stato previamente testato. I gruppi hanno ripreso l'assunzione del prodotto o di acqua rispettivamente, nelle medesime quantità e modalità, a partire dai 3 giorni prima dello svezzamento fino al giorno di svezzamento escluso (giorno 23). Dal giorno dello svezzamento fino al 5° giorno post-svezzamento ai due gruppi della sperimentazione sono stati somministrati prodotto e acqua in quantità di 100ml/suinetto/giorno in mangiatoie aperte. Tutti i maiali sono stati ulteriormente pesati singolarmente il giorno prima dello svezzamento (22° giorno) e al 34° giorno di vita.

Per quanto riguarda il consumo di prodotto e acqua in sala parto nei primi 7 giorni di trattamento è stato annotato il residuo giornaliero per nidiata. In svezzamento è stata segnata la quantità di mangime consumato dai due gruppi nei primi 12 giorni mentre sia in sala parto che in svezzamento sono stati annotati mortalità e trattamenti. Sono stati effettuati gli score fecali per nidiata ai giorni 2°, 4° e 9° di vita tramite un punteggio da 0 a 3, 0: feci normali, tutti sani; 1: alcuni suini colpiti, feci pastose; 2: molti suini colpiti, feci liquide; 3: tutti i suini colpiti, feci liquide, maiali scarni (Firth et al., 2017[1]). In svezzamento sono stati effettuati gli score fecali sul singolo animale ai giorni 30° e 34°, tramite un sistema di punteggio in una scala da 0 a 2, 0: assenza di diarrea; 1: tracce di diarrea; 2: diarrea evidente (Firth et al., 2017[2]).

Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei pesi e consumi è stato utilizzato il modello generale linearizzato attraverso la procedura delle misure ripetute. Per lo studio dei pesi, il gruppo e l'intervallo sono stati posti come fattore fisso mentre il peso iniziale come covariata per uniformare i pesi alla nascita e il suinetto come variabile random. Per l'analisi dei consumi, il gruppo e l'intervallo sono stati inseriti come fattore fisso e senza covariata. Infine per l'analisi degli score fecali è stato utilizzato il Test T mentre per mortalità e trattamenti il Chi-square.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i dati raccolti sono stati elaborati confrontando i risultati del gruppo trattato e del gruppo controllo.

I risultati più interessanti sono emersi dallo studio dell'accrescimento dei due gruppi; innanzitutto il peso iniziale è stato inserito come covariata in modo da uniformare i pesi alla nascita, dopo di che sono state paragonate le successive due pesate. Al giorno 22°, il gruppo trattato aveva un peso medio di 5,876 kg contro i 5,593 kg del gruppo controllo, risultando quindi più pesante e statisticamente significativo ($p<0,05$). Al giorno 34°, il gruppo trattato presentava un peso medio di 7,170 kg risultando quindi nettamente più pesante e statisticamente significativo rispetto al gruppo controllo che aveva un peso medio di 6,837 kg ($p<0,05$) Tabella 1.

Tabella 1. Differenze fra i pesi medi del gruppo trattato e del gruppo controllo, effettuate a rispettivamente al 22° giorno di vita, ancora in sala parto ed al 34° giorno di vita nello svezzamento. I dati con lettere minuscole diverse (a e b) sono differenti (P<0.05)
Table 1*. Differences between the average weight of the treated group and the control group, carried out respectively at the 22nd day of life, still in the delivery room and at the 34th day of life during weaning. Data with different lowercase letters (a and b) are different (P <0.05)*

	Gruppo controllo	**Gruppo trattato**
Peso 22° giorno (kg)	5,593[a] ± 0,088	5,876[b] ± 0,085
Peso 34° giorno (kg)	6,837[a] ± 0,103	7,170[b] ± 0,099

In particolare il giorno prima dello svezzamento, i suinetti trattati pesavano mediamente 282 grammi in più rispetto al controllo e al giorno 34 questa differenza era di 332 grammi (Tabella 2).

Tabella 2. Confronto fra le differenze di peso fra le pesate del 22° e del 34° giorno rispettivamente per il gruppo trattato e per il gruppo controllo. I dati con lettere minuscole diverse (a e b) sono differenti (P<0.05)
Table 2*. Comparison of weight differences between the 22nd and 34th day for the treated group and the control group, respectively. Data with different lowercase letters (a and b) are different (P <0.05)*

	Differenza di peso (gr) fra il 22° giorno ed il 34 ° giorno	***p value***
Gruppo controllo	282[a] ± 0,121	0,020[a]
Gruppo trattato	332[b] ± 0,140	0,019[b]

Questi dati confermano ulteriormente i dati emersi dagli studi precedenti e il fatto che una corretta somministrazione del prodotto in sala parto e nella fase di transizione allo svezzamento possa favorire un maggiore accrescimento (Firth et al., 2017[1]). Inoltre, avendo annotato la quantità di mangime consumata dai due gruppi durante i primi 12 giorni post-svezzamento, è stato possibile verificare che, anche a parità di mangime consumato dai due gruppi, il gruppo trattato ha presentato una migliore efficienza alimentare con 0,63 contro 0,57 per il controllo e quindi un migliore indice di conversione alimentare con 1,58 contro 1,76 (Tabella 3).

Tabella 3. Indice di conversione alimentare (ICA) nei primi 12 giorni post-svezzamento.
Table 3*. Food conversion index during the first 12 days post-weaning.*

	Gruppo controllo	**Gruppo trattato**
ICA	1,76	1,58

Questi risultati sono particolarmente interessanti in quanto un maggior accrescimento durante la prima settimana post-svezzamento ha un grande impatto sulle prestazioni economiche successive del suinetto (Pluske et al., 1997).
Il maggior accrescimento legato alla somministrazione di questo prodotto non è imputabile ad un maggior apporto calorico poiché la soluzione proteica isotonica non contiene un

quantitativo di energia tale da spiegare questo incremento, ma piuttosto è riconducibile ad una migliore idratazione e nutrizione delle cellule intestinali. Il profilo amminoacidico/proteico e l'isotonicità del prodotto rappresentano il punto forte della bevanda, in quanto forniscono un valido e ricco supporto diretto alle cellule intestinali, senza determinare squilibri elettrolitici. Un buon rinnovo degli enterociti garantirà un miglior assorbimento, una minore insorgenza di disidratazione e quindi un migliore accrescimento. Durante la lattazione, l'idratazione del suinetto dovrebbe essere garantita dalla corretta assunzione di latte dalla scrofa (costituito per più dell'80% di acqua) ma spesso viene a meno in covate numerose o quando la madre, a seguito di molteplici problematiche, non riesce a produrre una quantità sufficiente di latte per tutta la nidiata; in questi casi riuscire a fornire una completa idratazione agli animali promuove un miglior tasso di sopravvivenza per i suinetti (Fraser et al., 1988). Inoltre è stato evidenziato che, nell'immediato periodo post-svezzamento, può esserci una significativa percentuale di animali che hanno un'assunzione anormale di acqua durante le prime 48 ore (Brooks et al., 1984), determinando quindi uno stato di disidratazione subclinica spesso difficilmente individuabile.
In generale è importante sottolineare che l'ampio consumo del prodotto è facilitato dalla sua appetibilità e dal fatto che venga somministrato in ciotole aperte in modo da stimolare la normale curiosità del suinetto. Allo stesso tempo è importante che questi contenitori siano ben puliti ogni giorno per evitare eventuali contaminazioni fecali del prodotto e quindi una possibile alterazione dell'isotonicità caratteristica dello stesso.
Per quanto riguarda il consumo di prodotto dal 2° al 8° giorno non sono emerse particolari differenze tra i due gruppi, tutte le nidiate hanno consumato ogni giorno 400 ml di prodotto o acqua. Gli score fecali effettuati in sala parto e in svezzamento non hanno presentato differenze (Tabella 4). Anche per quanto concerne la mortalità, sia in sala parto che in svezzamento non vi sono differenze significative. Questo dato non è in linea con lo studio di Firth et al., 2017[1], nel quale è stata registrata una diminuzione della mortalità pre-svezzamento, probabilmente perché per entrambi i gruppi del nostro studio la mortalità è risultata essere comunque molto bassa (< 3%), anche come conseguenza del fatto che si è valutato un numero contenuto di animali.

Tabella 4. Confronto consumo medio al giorno di acqua/prodotto nei 7 giorni e score fecali in sala parto e durante lo svezzamento.
Table 4*. Comparison mean consumption for day of water/product during 7 days and fecal score during farrowing and weaning periods.*

	Gruppo controllo	**Gruppo trattato**	***p value***
Consumo Medio Acqua/Prodotto nei 7 giorni (ml)	492	489	0,29
Score fecale medio sala parto	0,12	0	0,15
Score fecale 28° giorno	0,42	0,54	0,15
Score fecale 34° giorno	0,15	0,14	0,45

CONCLUSIONI
Il prodotto testato in questo studio si è rivelato particolarmente efficace per quanto riguarda la sua azione di supporto e nutrimento dell'apparato enterico dei suinetti. Infatti ha determinato un accrescimento maggiore ben visibile sia nella pesata del 22° che in quella del 34° giorno di vita, le quali sono state effettuate quando gli animali erano sotto trattamento o avevano

terminato da poco l'assunzione. In generale un maggior peso allo svezzamento, predispone poi a prestazioni zootecniche migliori nelle fasi successive dell'accrescimento (Pluske et al., 2005). Inoltre, il gruppo trattato ha un migliore indice di conversione alimentare e quindi l'assunzione di questa soluzione proteica isotonica ha fatto in modo che gli animali trasformassero meglio il mangime consumato. In conclusione, questo prodotto risulta essere un valido supporto per favorire lo sviluppo delle cellule intestinali, quindi un migliore assorbimento dei principi nutritivi sia durante la lattazione che nella prima fase post-svezzamento. Inoltre essendo una bevanda piuttosto appetibile, riduce notevolmente i rischi di disidratazione soprattutto dopo lo svezzamento. È qui che infatti, la perdita della frazione acquosa contenuta nel latte materno oltre che le difficoltà di individuazione dei punti di abbeverata legate alla nuova struttura, rappresentano per il suinetto degli ostacoli spesso difficili da affrontare e fonti di costanti stress.
Interessanti sviluppi di ricerca ci auguriamo possano essere implementati sia nel contesto sanitario, come nel caso del trattamento delle diarree neonatali, che in quello nutrizionale in relazione al miglioramento delle prestazioni alimentari che sono ben evidenti sui soggetti più pesanti allo svezzamento rispetto ai parietari più leggeri.

RINGRAZIAMENTI:
Un ringraziamento particolare alla propietà dell'Azienda Agricola La Fortezza di Magreta (Mo), per aver messo a disposizione l'azienda per la prova e ad alla Dott.ssa Ilaria Rivi, laureata in produzioni animali e controllo della fauna selvatica presso l'Università di Bologna per la collaborazione. Infine un sentito ringraziamento al Dott. Alberto Colzani e ad Add-CO Nutrition per aver permesso lo svolgimento dello studio e per aver fornito il prodotto oggetto della prova.

BIBLIOGRAFIA

1. Brooks P., Russell S., Carpenter J. (1984). "Water intake of weaned piglets from three to seven weeks old". Vet. Rec. 115, 513-515.
2. Cortyl M., Firth A., Higgins C. (2018). "Get it right from the start". www.dairyglobal.net.
3. [1]Firth A.M., Cano G.L., Alujas A.M. (2017) "Effect of Tonisity Px™ administration on pre-weaning mortality and weight gain". 48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, 25-28 February 2017, 131-133.
4. [2]Firth A.M., Cano G.L., Alujas A.M. (2017) "Effect of gruel and Tonisity Px™ on feed intake and weight gain at weaning". 48th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians, 25-28 February 2017, 134-137.
5. Firth A.M., Van der Peet-Schwering C.M.C., Verheijen R., Luiten L. (2018). "Comparison of isotonic protein solution and milk replacer in suckling pigs". 10th European Symposium of Porcine Health Management, 9-11 May 2018.
6. Fraseri P., Phillips B.K., Thompson B.K., Peeters Weem W.B. (1988). "Use of water by piglets in the first days after birth". Can. J. Anim. Sci. 68, 603-610
7. Pluske R. J., Hampson D. J., Williams I.H. (1997). "Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review" Lives. Prod. Sci. 51(1–3), 215-236.
8. Pluske R.J., Payne H.G., Williams I.H., Mullan B.P. (2005). "Early feeding for lifetime performance of pigs". Animal Nutrition in Australia. 15, 171-181.
9. Smith M. W., Jarvis L. G. (1978). "Growth and Cell Replacement in the New-Born Pig Intestine". Royal Society Great Britain. 203 (1150), 69-89.

IL PRELIEVO DALLA VENA MAMMARIA: UN NUOVO METODO DI PRELIEVO NELLE SCROFE IN LATTAZIONE PER RISPARMIARE TEMPO E LAVORO

BLOOD SAMPLING FROM MAMMARY VEIN: A NEW SAMPLING METHOD IN LACTATING SOW TO SAVE TIME AND LABOUR

ROMANO G.[1], SCOLLO A.[1], TAGLIAFERRI L.[1], RIGHI F.[2], BRESCIANI C.[2], MAZZONI C.[1]

[1] Suivet, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; [2] Università degli studi di Parma, Strada del Taglio 10, 43126 Parma, Italia.

Parole chiave: prelievo di sangue, vena mammaria, tempo e lavoro
Key words: blood sample, mammary vein, time and labour

RIASSUNTO
Oggigiorno, nel mondo suinicolo, le analisi del sangue rappresentano un importantissimo strumento per tenere monitorati gli aspetti sanitari aziendali. La possibilità che una sola persona possa eseguire in poco tempo molti prelievi, e senza l'aiuto di una seconda figura, non deve essere sottovalutata.
Il principale scopo di questo studio è stato di illustrare un nuovo metodo di prelievo, che permetta, appunto, di risparmiare tempo e lavoro: il prelievo dalla vena mammaria. Poiché questo metodo è applicabile esclusivamente nelle scrofe in lattazione, unico momento in cui la vena mammaria è ben sviluppata e accessibile, gli autori hanno deciso di mettere in contrapposizione il nuovo metodo di prelievo con il classico prelievo dalla vena giugulare, sempre effettuato in sala parto. In particolare, sono stati creati due gruppi di prelievo e sono stati messi a confronto quattro parametri: la velocità di esecuzione, la quantità di lavoro richiesto, la quantità di sangue prelevato e i valori di cortisolo plasmatico riscontrati al prelievo e 30 minuti dopo.
Lo studio non ha evidenziato la presenza di differenze significative per tre dei quattro parametri; solo la quantità di lavoro richiesto è risultata significativamente inferiore per l'esecuzione del prelievo dalla vena mammaria, traducendosi questo in un importante risparmio di tempo e lavoro.

ABSTRACT
Today, blood analysis in swine represent an important tool to ensure the health of the farm. It would be very useful if a person was able to perform many blood samples by himself in a short time.
The aim of this study was primary to describe in detail a new sampling method, that allow to save time and labour: the blood sampling from the mammary vein. This alternative method can be performed only in lactating sow, due to the development of the mammary vein during this phase. Fort this reason the authors decided to describe also the blood sampling from the jugular vein, that is common used in the farrowing rooms. For the study were created two groups of sampling and four parameters were compared: the sampling time, the labour demand requested, the blood amount and the plasma cortisol at the time of the withdrawal and 30 minutes later.
The study did not highlight the presence of significant differences for three of the four parameters; only the labour demand requested was significantly lower for the sampling from mammary vein, that means an important saving of time and labour.

INTRODUZIONE

Nell'ambito della pratica dell'allevamento suinicolo esistono diverse tecniche per effettuare un prelievo di sangue. In particolare, i punti di accesso nel suino sono: la vena giugulare, la vena cava anteriore, la vena auricolare, i vasi della coda, il seno orbitale, la vena femorale, la vena cefalica e la vena addominale. La scelta del punto di accesso migliore dipende principalmente dalla taglia dell'animale, dalla difficoltà di esecuzione e, ultima ma non meno importante, dall'esperienza dell'esecutore. Infatti, tutti i principali vasi sanguigni del suino non sono visibili e ciò richiede una notevole pratica ed una adeguata conoscenza dell'anatomia suina (Zimmerman et al., 2012).
I punti di accesso sopra nominati richiedono tutti un contenimento dell'animale, indispensabile per la corretta esecuzione del prelievo e per garantire una sicurezza fisica a chi lo esegue. Nei suinetti fino ai 20 kg un contenimento manuale dovrebbe essere sufficiente, ma superato questo peso diventa necessario l'utilizzo di uno strumento che aiuti la persona a tenere fermo l'animale, strumento noto con il nome di torcinaso (Muirhead, 1981). Il contenimento con il torcinaso diventa sempre più difficoltoso con l'aumentare del peso del suino e l'impiego di due operatori è obbligatorio: una persona dovrà contenere il soggetto, mentre l'altra dovrà eseguire il prelievo (Mazzoni, 2014). La difficoltà aumenta ancor di più quando il sangue da prelevare appartiene alle scrofe alloggiate in sala parto, poiché le singole gabbie parto dispongono di uno spazio limitato a causa della presenza della mangiatoia, spazio in cui due persone devono cercare di agire contemporaneamente. L'esistenza di un'alternativa per prelevare il sangue nelle scrofe in sala parto, come l'accesso dalla vena mammaria, potrebbe rilevarsi davvero interessante poiché semplificherebbe l'intero processo di prelievo, rendendo inutile l'utilizzo del torcinaso e, di conseguenza, la presenza di una seconda persona che contenga l'animale, oltre a risolvere il problema legato allo spazio limitato d'azione.
Lo scopo di questo studio è stato quindi fornire una dettagliata descrizione del metodo di prelievo dalla vena mammaria, partendo dalle basi anatomiche dell'accesso venoso, in modo che questa nuova tecnica possa essere ben compresa e utilizzata nella pratica di allevamento. Essendo il prelievo dalla vena giugulare il metodo più comunemente utilizzato in sala parto, gli autori hanno voluto fornire una descrizione dettagliata anche di questa tecnica di prelievo, utilizzando lo stesso schema descrittivo della vena mammaria. Inoltre, i due metodi di prelievo sono stati messi a confronto in quanto velocità di esecuzione, quantità di lavoro richiesto, quantità di sangue prelevato e risposta allo stress, quest'ultima mediante la misurazione del cortisolo plasmatico. Diversi studi (Barnett et al., 1996; Möstl e Palme, 2002) dimostrano infatti che alti livelli di cortisolo nel sangue rappresentano un indice di stress. Il nostro intento è stato quello di valutare se il contenimento con il torcinaso potesse essere considerato un fattore altamente stressante per la scrofa rispetto al suo non utilizzo.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in un allevamento intensivo sito nella provincia di Brescia (Italia), il cui stato sanitario è considerato "convenzionale" e, più nel dettaglio per quanto attiene alla sola PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*), stabile-inattivo al momento della prova. L'allevamento è costituito da una scrofaia, che è organizzata in banda settimanale e alloggia circa 2000 scrofe di genetica danese (Dan Bred International®, Denmark), e da uno svezzamento, che è situato ad una distanza di circa 5 km e in cui vengono trasferiti i suinetti in seguito all'allontanamento dalla madre. Il management aziendale segue le procedure operative standard (SOPs) per quanto riguarda le vaccinazioni, l'accasamento, la pulizia, la gestione dei rifiuti e le misure di biosicurezza. Le scrofe ricevono un'alimentazione ti tipo liquido sia in gestazione che in lattazione, ma nel primo caso l'alimento è distribuito in modo automatico mentre nel secondo caso in modo semiautomatico. La temperatura delle stanze è mantenuta tra i 20 e i 23°C ed è presente una ventilazione a pressione negativa oltre che un sistema di raffrescamento, tipo cooler, operativo durante i mesi più caldi dell'anno.
Lo studio è stato condotto tra maggio e giugno 2018 e ha visto coinvolte 68 scrofe pluripare (scrofette e balie sono state escluse). Le scrofe della prova sono state selezionate all'interno di sale parto contenenti gabbie parto di tipo convenzionale, le quali erano posizionate su due file, una davanti all'altra, e separate da un corridoio ampio di 1,25 metri. In ogni sala era presente un sistema di ventilazione a pressione negativa in grado di espellere continuamente l'aria all'esterno dell'edificio ad una velocità di 6,8 m^3/min. Ciascuna gabbia parto (2700×1700 mm) conteneva l'area della scrofa (2100×600 mm), circondata da sbarre in metallo atte a limitarne i movimenti, e una mangiatoia di 0.5×1.5 metri posizionata di fronte alla scrofa stessa; il pavimento era di metallo rivestito in plastica.
Le scrofe sono state suddivise in due gruppi in base al metodo di prelievo utilizzato: 34 scrofe hanno ricevuto il prelievo dalla vena mammaria (Gruppo M), mentre le altre 34 lo hanno ricevuto dalla vena giugulare (Gruppo G). I due gruppi sono stati selezionati casualmente, con la sola accortezza che le sale parto ospitanti il Gruppo G fossero abbastanza distanti dalle altre, in modo da evitare che le urla generate dall'applicazione del torcinaso disturbassero negativamente le scrofe del Gruppo M. La prova è stata sviluppata in due giornate diverse, entrambe al pomeriggio (ore 15.00): il primo giorno ha visto coinvolte 17 scrofe per ciascun gruppo, alloggiate all'interno di sale parto contenenti 20 gabbie parto convenzionali l'una; anche il secondo giorno ha coinvolto 17 scrofe per gruppo, ma, questa volta, ciascun gruppo era distribuito su due sale parto frontali ciascuna contenente 10 gabbie parto convenzionali.
Sono state formate due unità lavorative diverse, in modo che la prova avvenisse contemporaneamente in entrambi i gruppi. In particolare, il Gruppo M era costituito da un veterinario esperto nei prelievi di sangue e da un assistente munito di cronometro e block notes, mentre il Gruppo G era costituito da due persone, aventi le medesime caratteristiche del Gruppo M, e da una terza persona, adibita al contenimento delle scrofe mediante l'applicazione del torcinaso.
Il tempo di esecuzione del prelievo è stato misurato dall'assistente grazie all'utilizzo di un cronometro, che veniva avviato nel momento in cui il veterinario (Gruppo M) o l'operatore munito di torcinaso (Gruppo G) entravano all'interno della gabbia parto, e stoppato al termine del prelievo. Al fine di meglio quantificare il fattore tempo, impiegato per l'esecuzione delle due metodologie di prelievo, abbiamo inserito il parametro: "quantità totale di lavoro richiesto", ottenuta moltiplicando il tempo di campionamento per il numero di operatori coinvolti nel prelievo.
Tutte le scrofe di entrambi i gruppi hanno ricevuto il prelievo di sangue due volte: il primo al fine di annotare la tempistica di esecuzione e per disporre di un valore di cortisolo plasmatico al tempo 0 (T_0); il secondo, in entrambi i gruppi eseguito dalla vena mammaria, per disporre di un valore di cortisolo una volta trascorsi 30 minuti dall'evento "prelievo di sangue" (T_{30}). È stato scelto di aspettare mezz'ora dal primo prelievo in accordo con studi precedenti, che hanno mostrato un picco di cortisolo a 30 minuti da un evento stressante, quale può essere la castrazione nei suinetti (Gottardo et al., 2016) o il tenere legate con una corda le scrofette (Becker et al., 1984). Nel nostro caso consideriamo come evento stressate il prelievo di sangue in sé, con particolare attenzione al Gruppo G per l'utilizzo del torcinaso come mezzo di contenimento.
Una volta raccolti i campioni, questi sono stati trasportati al laboratorio dell'Università di Parma, a temperatura di refrigerazione, per essere processati e successivamente inviati all'IZS di Reggio Emilia per lo svolgimento delle analisi relative al cortisolo. Contestualmente alla processazione è stata anche annotata la quantità di sangue prelavata per singolo campione.

Vena mammaria: descrizione anatomica del punto di accesso e metodo di prelievo

La vascolarizzazione della mammella è molto abbondante nella scrofa, soprattutto durante la

fase di lattazione; basti pensare che per ogni litro di latte prodotto è necessario il passaggio, a livello mammario, di ben 400 litri di sangue (Barone, 2009). La figura 1 mostra in dettaglio il sistema circolatorio della mammella nella scrofa.

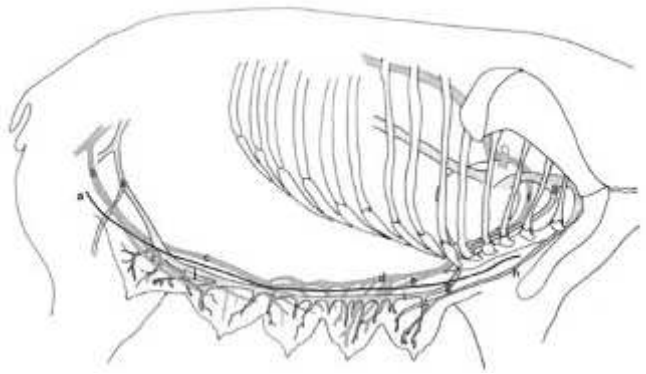


Figura 1. Sistema circolatorio della mammella nella scrofa. (a) parete addominale; (b) arteria pudenda esterna; (c) branche dell'arteria pudenda; (d) arteria epigastrica superficiale caudale; (e) arteria epigastrica craniale; (f) arteria toracica interna; (g) vena toracica interna; (h) vena toracica esterna; (i) vena mammaria anteriore; (j) vena mammaria posteriore; (k) vena pudenda esterna.
Figure 1. *Sow's mammary circulatory system. (a) abdominal wall; (b) external pudendal artery; (c) branches of the pudendal artery; (d) caudal superficial epigastric artery; (e) cranial epigastric artery; (f) internal thoracic artery; (g) internal thoracic vein; (h) external thoracic vein; (i) anterior mammary vein; (j) posterior mammary vein; (k) external pudendal vein.*

In corrispondenza della linea mammaria è presente, da entrambi i lati, un doppio arco arterioso longitudinale, composto da un arco superficiale e uno profondo. Quest'ultimo comprende l'arteria toracica interna, l'arteria epigastrica craniale e l'arteria epigastrica caudale; le branche delle due arterie epigastriche sono anastomizzate nella parete addominale dove si intrecciano con l'arco superficiale, che comprende l'arteria toracica laterale e l'arteria epigastrica superficiale caudale (Barone, 2009). Altri due lunghi archi, simili a quelli arteriosi e sempre suddivisi in superficiale e profondo, compongono il sistema venoso, anch'esso esteso in corrispondenza della linea mammaria e su entrambi i lati. Le mammelle anteriori, ovvero posizionate in regione toracica e addominale, sono drenate dalle vene mammarie anteriori, anche conosciute con il nome di vene addominali sottocutanee o di vene epigastriche superficiali craniali, che seguono un percorso parallelo ai due lati del sistema circolatorio mammario. Queste vene confluiscono principalmente all'interno della vena toracica interna, anche se alcuni rami laterali si riversano nella vena toracica esterna. Le mammelle posteriori, posizionate in regione inguinale, sono drenate dalle stesse vene addominali sottocutanee, ma identificate come vene mammarie posteriori, le quali confluiscono all'interno della vena pudenda esterna (Linzell, 1974; Turner, 1952). Esiste comunque un'importantissima differenza tra i due sistemi circolatori: le vene sono più voluminose, più anastomizzate e meno profonde delle corrispondenti arterie. Inoltre, uno studio (Trottier et al., 2014) riporta che il sistema arterioso si trova in gran parte all'interno della cavità addominale e dorsalmente alla parete addominale, mentre il sistema venoso si trova completamente al di fuori della cavità addominale e ventralmente alla parete addominale. È per questo motivo che i prelievi di sangue vengono effettuati dal sistema venoso e non dal sistema arterioso. In particolare, il punto migliore per accedere alla vena mammaria si trova in corrispondenza della seconda o terza mammella, in prossimità della linea di separazione tra

il muscolo addominale obliquo esterno e la parte ghiandolare della mammella stessa, oppure a livello della depressione tra le due ghiandole mammarie (Mazzoni, 2014). Si preferiscono le mammelle anteriori poiché rappresentano la principale via di uscita venosa a livello mammario, oltre al fatto che l'involuzione delle mammelle sembra iniziare a partire dalla regione inguinale (Trottier et al., 2014).
Gli strumenti necessari per effettuare un prelievo dalla vena mammaria sono: un paio di guanti, aghi monouso 20G×35mm e provette Vacutainer da 10 ml. Il prelievo può essere eseguito con la scrofa in stazione quadrupedale, seduta o in decubito laterale, che, secondo l'opinione degli autori, sarebbe da preferirsi. L'ago deve essere inserito in maniera perpendicolare al punto di accesso sopra descritto (Mazzoni, 2014). Grazie a questo metodo il contenimento non è necessario ed è sufficiente la presenza di una sola persona per l'esecuzione del prelievo.

Vena giugulare: descrizione anatomica del punto di accesso e metodo di prelievo
Nel suino, tutto il sangue proveniente dalla testa e dal collo viene drenato da due vene giugulari per lato: una interna, più sottile, e una esterna, più robusta. La figura 2 mostra in dettaglio la vascolarizzazione venosa del collo nel suino.

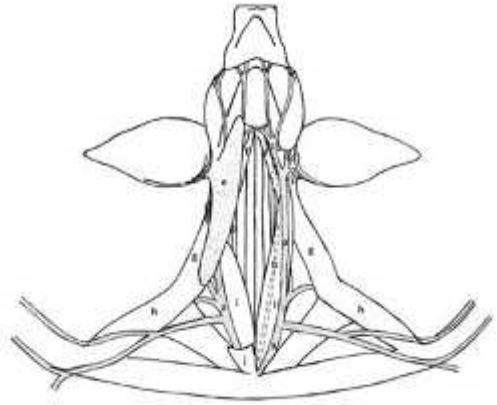


Figura 2. Vascolarizzazione venosa del collo nel suino. (a) vena giugulare esterna; (b) vena giugulare interna; (c) vena linguofacciale; (d) vena retromandibolare; (e) ghiandola parotide; (f) muscolo omo-ioideo; (g) muscolo cleidocefalico; (h) muscolo cleidobrachiale; (i) muscolo sternocefalico; (j) muscolo sfintere del collo.
Figure 2. *Venous vascularisation of the pig's neck. (a) external jugular vein; (b) internal jugular vein; (c) linguofacial vein; (d) retromandibular vein; (e) parotid gland; (f) homo-ioideo muscle; (g) cleidocephalic muscle; (h) cleidobrachial muscle; (i) sternocephalic muscle; (j) neck's sphincter muscle.*

La vena giugulare esterna è il vaso più voluminoso presente nel collo e drena il sangue proveniente dalla faccia, dalle regioni esterne del cranio e dalla regione ventrale del collo. Questa vena origina all'inizio del collo, sul lato della regione laringea, da due radici che creano un angolo acuto: la vena linguofacciale e la vena retromandibolare. La vena giugulare esterna percorre la maggior parte del suo tragitto al di sotto della pelle e sotto il muscolo sfintere del collo, per poi approfondarsi alla base del collo, dove riceve la terminazione della vena giugulare interna. La confluenza delle due vene giugulari crea un piccolo tronco che riceve le due vene succlavie, formando così una vena brachiocefalica molto corta. Quest'ultima rappresenta la radice della vena cava craniale, situata all'entrata del torace (Barone, 2011).

Per eseguire il prelievo dalla vena giugulare è essenziale che il solco giugulare sia ben visibile, e ciò è possibile solo grazie ad un corretto contenimento dell'animale. Gli strumenti necessari per l'esecuzione del prelievo sono: un paio di guanti, aghi monouso 18G×38mm, provette Vacutainer da 10 ml, un torcinaso e tappi per le orecchie. L'animale deve essere contenuto in posizione quadrupedale, con i quattro arti ben appoggiati sul terreno e in modo che gli anteriori siano allineati con i posteriori; la testa deve essere ben sollevata per mettere in evidenza il solco giugulare. La persona addetta al prelievo deve inginocchiarsi di fronte alla testa dell'animale e inserire l'ago circa 5 cm cranialmente dall'ingresso toracico, perpendicolarmente alla cute e leggermente verso la linea mediana, nel punto più profondo del solco giugulare. Se non si raggiunge subito la vena sarà necessario muovere delicatamente l'ago avanti e indietro fino al suo raggiungimento e al riempimento della provetta (Zimmerman et al., 2012; Muirhead, 1981).
È da preferirsi il lato destro del collo poiché il nervo vago destro fornisce meno innervazione al cuore e al diaframma rispetto al nervo vago sinistro e toccare accidentalmente il nervo vago potrebbe causare dispnea, cianosi e convulsioni all'animale (Dewey e Straw, 2006).

Analisi statistica
L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software IBM SPSS versione 25. Al fine di quantificare la domanda di lavoro richiesta per entrambe le tecniche, il tempo di campionamento è stato moltiplicato per il numero di operatori coinvolti nel prelievo di sangue. La differenza tra i livelli di cortisolo nei due gruppi agli intervalli considerati (T_0 e T_{30}) è stata analizzata utilizzando un modello misto che prevede come fattore fisso il gruppo e come fattore ripetuto l'intervallo temporale, includendo la scrofa come fattore casuale. La differenza nella variazione tra i due intervalli nei due gruppi, il tempo di esecuzione del prelievo e la quantità di sangue prelevato sono stati confrontati utilizzando il *t* test per campioni indipendenti.

RISULTATI
L'ordine di parto medio e i giorni medi di lattazione delle scrofe coinvolte nello studio è stato di 4 parti e 22 giorni per entrambi i gruppi. Anche la velocità di esecuzione del prelievo è stata molto simile (Tabella 1).

	Tempo medio (s)	Quantità totale di lavoro (s)
Group M	39,83 ± 29,45	79,66 ± 58,9[a]
Group G	41,36 ± 27,67	124,08 ± 83,01[b]

Tabella 1. Tempo medio impiegato per l'esecuzione del prelievo e quantità totale di lavoro richiesto, misurati in secondi (s), nel Gruppo M e nel Gruppo G. I dati con lettere minuscole diverse (a e b) sono differenti (P<0.001).
Table 1*. Average time sampling and labour, measured in seconds (s), in Group M and Group G. Data with different lowercase letters (a and b) are different (P<0.001).*

È possibile notare dalla Tabella 1 che il Gruppo M ha risparmiato qualche secondo di tempo rispetto al Gruppo G, senza però mostrare alcuna differenza significativa (P=0.82), mentre la quantità totale di lavoro richiesto ha evidenziato una forte significatività a favore del Gruppo M (P<0.001).
La quantità di sangue prelevata al momento del primo prelievo è stata di 4.81±2.00 ml per il gruppo G e di 4.84±1.73 ml per il Gruppo M, non evidenziando differenze significative (P> 0.05).
In entrambi i gruppi, i valori medi di cortisolo a T_0 si sono rilevati più elevati rispetto ai valori medi a T_{30} (Tabella 2), contrariamente alle aspettative degli autori.

	Media (µg/dL)		Massimo (µg/dL)		Minimo (µg/dL)	
	T_0	**T_{30}**	**T_0**	**T_{30}**	**T_0**	**T_{30}**
Group M	8,1 ± 4,2	5,5 ± 2,2	18,4	12,1	0,1	0,8
Group G	7,0 ± 3,7	5,3 ± 2,4	19,8	10,5	2,4	1,9

Tabella 2. Valori medi, massimi e minimi del cortisolo rilevato nel sangue al momento del prelievo (T_0) e dopo 30 minuti (T_{30}) nel Gruppo M e nel Gruppo G, misurati in µg/dL.
Table 2*. Average, maximal and minimal values of cortisol level in the blood plasma at the time of the withdrawal (T_0) and after half an hour (T_{30}) in Group M and Group G, measured in µg/dL.*

Il confronto statistico tra i due gruppi non ha riportato alcuna differenza significativa (P=0.82), essendo i valori di cortisolemia molto simili. È stato analizzato anche il delta del cortisolo plasmatico (T_0 - T_{30}), ma anche in questo caso il confronto tra i due gruppi non ha riportato differenze significative (P= 0.39).

DISCUSSIONE
Lo scopo di questo studio è stato di proporre un nuovo metodo di prelievo di sangue nella scrofa in lattazione, metodo reputato vantaggioso in base all'esperienza degli autori. L'idea di confrontare il nuovo metodo dalla vena mammaria con il classico metodo dalla vena giugulare, è nata al fine di trovare possibili vantaggi o svantaggi a favore o sfavore di una delle due tecniche, in modo da fornire un maggior numero di elementi per la scelta del metodo migliore.
Dall'analisi dei risultati ottenuti è stato possibile evincere che, se gli addetti al prelievo fossero ugualmente esperti in entrambe le tecniche, allora la velocità di esecuzione risulterebbe essere molto simile, a patto che anche l'incaricato al contenimento dell'animale sia abile a immobilizzare correttamente e immediatamente l'animale. Se solo viene a mancare l'esperienza adeguata il tempo di esecuzione può pendere a favore o a sfavore dell'una o dell'altra tecnica indistintamente. Inoltre, è stata prelevata la stessa quantità di sangue nei due gruppi e ciò conferma che entrambi i metodi consentono di prelevare la quantità di sangue desiderata nello stesso arco di tempo. Un'importante differenza, invece, è stata riscontrata per quanto riguarda l'analisi della quantità totale di lavoro richiesto. In questo caso i risultati evidenziano che il prelievo dalla vena mammaria riduce drasticamente la quantità totale di lavoro richiesto, il che rappresenta un fattore essenziale per l'industria suinicola, in quanto un risparmio di lavoro, e quindi di tempo, si traduce in una maggiore competitività dell'allevamento (Martel et al., 2008). La classica situazione che si verifica in allevamento, infatti, è che un operatore aziendale sacrifichi parte del suo lavoro per aiutare nel contenimento della scrofa, togliendo così forza-lavoro all'allevamento per un periodo di tempo più o meno lungo. Grazie al prelievo dalla vena mammaria il personale aziendale non verrebbe più chiamato in causa, traducendosi in un prezioso risparmio di tempo e lavoro. Inoltre, se due persone fossero entrambe abili ad eseguire questo tipo di prelievo sarebbe sprecato far contenere l'animale a uno dei due: a parità di soggetti da prelevare, si impiegherebbe la metà del tempo piuttosto che eseguire in due il prelievo dalla vena giugulare. Va comunque precisato che anche questo nuovo metodo di prelievo ha il suo svantaggio: può infatti essere realizzato solo quando la vena mammaria è ben sviluppata e accessibile, limitando quindi il suo utilizzo alle scrofe in lattazione.
I valori della cortisolemia meritano invece un discorso a parte, poiché i risultati ottenuti non hanno rispecchiato le aspettative degli autori. È stato deciso di misurare il cortisolo plasmatico in quanto considerato un importante indicatore di stress nel suino (Fenske et al., 1981; Spencer, 1980; Baldwin and Stevens, 1973).
È importante sapere, però, che i valori della cortisolemia cambiano a seconda della fase di crescita dell'animale, delle condizioni ambientali e delle individualità del soggetto stesso. Ogni

individuo, infatti, reagisce in modo differente allo stress (Pavičič et al., 2003) e ciò potrebbe giustificare la discrepanza con la letteratura (Gottardo et al., 2016; Becker et al., 1984) secondo cui a mezz'ora da un evento stressante si verifica un picco di cortisolemia. È difficile stabilire un valore standard di cortisolo plasmatico nel suino; l'unico dato certo è la presenza di un ritmo circadiano, caratterizzato da un picco mattutino e da una depressione serale (Barnett et al., 1981; Spencer, 1979; Killian et al., 1973; Bottoms et al., 1972; Mormede, 1988). Molti studi (Pavičič et al., 2003; Breineková et al., 2007; Jarvis et al., 1998; Razdan, 2003; Cabezón et al., 2017) mettono a confronto la cortisolemia misurata in assenza e in presenza di fattori stressanti di diversa entità (Tabella 3).

	Assenza di fattori stressanti (µg/dL)	Presenza di fattori stressanti (µg/dL)
Caso A - Suinetti	12,11	13,15
Caso B – Suini all'ingrasso	9,91	12,89
Caso C – Scrofette al parto	3,89	4,64
Caso D – Scrofe in gestazione	2,24	3,98
Caso E – Scrofe in lattazione	2,97	2,89

Tabella 3. Valori del cortisolo plasmatico in differenti categorie di suino e in differenti situazioni, in assenza o presenza di fattori stressanti di diversa entità, misurati in µg/dL. Caso **A** (Pavičič et al., 2003): cortisolo plasmatico in suinetti di 24 giorni, prima e dopo un trasporto post-svezzamento della durata di 65 minuti. Caso **B** (Breineková et al., 2007): cortisolo plasmatico in suini all'ingrasso (110±18 kg), prima e dopo un trasporto al macello della durata di 30 minuti. Caso **C** (Jarvis et al., 1998): cortisolo plasmatico in scrofette al parto, allogiate in gabbie parto con la paglia *vs* senza paglia. Caso **D** (Razdan, 2003): cortisolo plasmatico nelle scrofe in gestazione alloggiate in gabbie parto con la paglia, con normale assunzione dell'alimento *vs* privazione dell'alimento. Caso **E** (Cabezón et al., 2017): cortisolo plasmatico nelle scrofe in lattazione ad una normale temperatura (22°C) *vs* un'alta temperatura (26-31°C), per simulare uno stress da caldo.
Table 3. *Plasma cortisol values in different swine categories and in different situations, in the absence or presence of different types of stressor, measured in* µg/dL. *Case **A** (Pavičič et al., 2003): blood cortisol in piglets of 24 days, before and after postweaning transport lasting 65 minutes. Case **B** (Breineková et al., 2007): blood cortisol in fattening pigs (110±18 kg), before and after transport to the slaughterhouse, which lasted 30 minutes. Case **C** (Jarvis et al., 1998): blood cortisol in parturient gilts, housed in pen provided with straw* vs *without straw. Case **D** (Razdan, 2003): blood cortisol in gestating sows housed in individual pens on straw, normal food intake* vs *food deprivation. Case **E** (Cabezón et al., 2017): blood cortisol in lactating sows at normal temperature (22°C)* vs *higher temperature (26-31°C), simulating heat stress.*

Da questa tabella è possibile constatare come ogni categoria di suino sia indipendente dalle altre: ognuna presenta infatti un differente livello iniziale di cortisolo, che si modifica considerevolmente a seconda della situazione in cui il soggetto vive. Le scrofe in lattazione ad una normale temperatura (Caso E, in assenza di fattore stressante) è la categoria che più si avvicina alla condizione descritta nel nostro studio. Il valore di riferimento per questa categoria (2.97 µg/dL) è comunque molto più basso se paragonato a quello trovato, al momento del primo prelievo, nel Gruppo M (8.1±4.2 µg/dL) e nel gruppo G (7±3.7 µg/dL). Considerando che l'aumento del cortisolo plasmatico per più del 40% è un indice di alterazione del benessere (Barnett e Hemsworth, 1990), è possibile ipotizzare che le scrofe presenti nello studio partissero già da una condizione di stress elevato, e che, per questo motivo, il contenimento con il torcinaso non abbia influenzato in maniera significativa la cortisolemia del Gruppo G. Secondo Möstl e Palme (2002), un'alta concentrazione di cortisolo

può essere associata ad una restrizione dell'attività dell'animale. Un recente studio (Van Der Staay et al., 2010) ha mostrato che le scrofe che passano molto tempo in una piccola gabbia (parte della gestazione, parto, lattazione e post-lattazione), in condizioni di inattività, hanno un cortisolo più elevato rispetto alle scrofe che rimangono in gruppo fino a pochi giorni prima del parto e subito dopo la lattazione. Il problema verificatosi nel nostro studio potrebbe quindi essere legato all'inattività della scrofa, che determina un aumento dello stress con conseguente aumento dei valori della cortisolemia. Durante il parto e la lattazione è però necessario che le scrofe stiano in gabbie parto individuali, ma la presenza di un arricchimento ambientale, quale la paglia, potrebbe ridurre lo stress causato dall'inattività in gabbia (vedi Caso C della Tabella 3).
Ulteriori studi sono quindi necessari per valutare il reale effetto del contenimento con il torcinaso sullo stress della scrofa, partendo però da soggetti molto meno stressati, magari alloggiati in gabbie parto provviste di paglia o in gabbie parto più ampie, che permettano una maggiore libertà di movimento.

CONCLUSIONI

Con questo studio si è voluto dimostrare la validità di un nuovo metodo di prelievo da utilizzare nelle scrofe in lattazione: il prelievo dalla vena mammaria. Questo, seppur a parità di velocità di esecuzione e di quantità di sangue prelevato, ha evidenziato una minore richiesta di tempo e lavoro rispetto al prelievo dalla vena giugulare, risultando così più vantaggioso nell'economia dell'allevamento. Unico limite è la possibilità di esecuzione solo nelle scrofe in lattazione, a causa della necessità di avere la vena mammaria ben disponibile e accessibile.
Poiché i valori di cortisolemia non hanno mostrato differenze significative tra i due metodi di prelievo, ulteriori studi, da effettuare su scrofe meno stressate in partenza, potrebbero avvalorare l'ipotesi che il contenimento con il torcinaso sia un fattore altamente stressante per la scrofa, soprattutto in un momento così delicato come la lattazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Baldwin, B. A., Stevens, D. B., (1973) The effects of conditioned behavior and environmental factors on plasma corticosteroid levels in pigs. Physi b l. Behavior, 10, 267-274.
2. Barnett, J. L., Cronin, G. M., McCallum, T. H., Newman, E. A., Hennesey, D. P. (1996) Effects of grouping of unfamiliar adult pigs after dark, after treatment with amperozide and by using pens with stalls, on aggression, skin lesions and plasma cortisol concentrations. Appl Anim Behav Sci 50, 121–33.
3. Barnett, J. L., Cronin, G. M., Winfield, C. G. (1981) The effects of individual and group penning of pigs on total and free plasma corticosteroids and the maximum corticosteroid binding capacity. Gen. Comp. Endocrinol., 44, 219-225.
4. Barnett, J. L., Hemsworth, P. H. (1990) The validity of physiological and behavioural measures of animal welfare. Appl. Anim. Behav. Sci. 25, 177 – 187.
5. Barone, R. (2009) Mammelle. In Anatomia comparata dei mammiferi domestici, vol. 4° Splancnologia: apparecchio uro-genitale, feto e suoi annessi, peritoneo e topografia addominale. 2° ristampa della 1ª edizione. Bortolami R. Edagricole. pp. 379-380.
6. Barone, R. (2011) Vene. In Anatomia comparata dei mammiferi domestici, vol. 5° Angiologia: parte seconda vene e sistema linfatico. 1° ristampa della 1ª edizione. Bortolami R., Callegari E. Edagricole. pp. 14-67.
7. Becker, B., Christenson, R., Ford, J., Manak, R., Nienaber, J., Hahn, G., Deshazer, J. (1984) Serum cortisol concentrations in gilts and sows housed in tether stalls, gestation stalls and individual pens. Annales de Recherches Vétérinaires, INRA Editions, 15 (2). pp. 237-242.
8. Bottoms, G. D., Roesel, C. F., Rausch, F. D., Akins, E. L. (1972) Circadian variation in plasma cortisol and corticosterone in pigs and mares. Am. J. Vet. Res., 33, 785-790.

9. Breineková, K., Svoboda, M., Smutná, M., Vorlová, L. (2007) Markers of Acute Stress in Pigs. Physiol. Res. 56, 323-329.
10. Cabezón, F. A., Stewart, K. R., Schinckel, A. P., Richert, B. T. (2017) Effects of betaine and heat stress on lactation and postweaning reproductive performance of sows. The Professional Animal Scientist 33, 241–253.
11. Dewey, C. E., Straw, B. E. (2006) Herd examination. In: Straw B. E., Zimmerman J. J., D'Alliare S., Taylor D. J., eds. Disease of swine, 9th edition. Blackwell Publishing. pp. 3-14.
12. Fenske, M., Voss, H. J., Welp, C., Koetnzer, B., Pich, S., Holtz, W. (1981) Activation of the pituitary adrenal system in the pig by stress factors: evidence for a slow and rapid adrenal response. Acta Endocrinol. Suppl., 26.
13. 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. Journal of animal science 94 (12), 5077-5088.
14. Jarvis, S., Lawrence, A. B., McLean, K. A., Chirnside, J., Deans, L. A., Calvert, S. K. (1998) The effect of environment on plasma cortisol and b-endorphin in the parturient pig and the involvement of endogenous opioids. Animal Reproduction Science 52, 139–151.
15. Killian, D. B., Gaverick, H. A., Day, B. N. (1973) Peripheral plasma progesterone and corticoid levels at parturition in the sow. J. Anim. Sci., 37, 1371-1375.
16. Linzell, J. L. (1974) Mammary blood flow and substrate uptake. In: Larson B. L. and Smith V. R. (Ed.) Lactation, a comprehensive treatise, vol. 1 The mammary gland, development and maintenance. Academic Press, New York. pp. 143-225.
17. Martel G., Dourmad J. Y., Dedieu B. (2008) "Do labour productivity and preferences about work load distribution affect reproduction management and performance in pig farms". Livestock Science 116, 96–107.
18. Mazzoni, C. (2014) Prelievo ematico dalla vena mammaria. http://www.suivet.it/prelievo-ematico-dalla-vena-mammaria.aspx (accessed 17 maggio 2018).
19. Mormede, P. (1988) Les reponses neuroendocriniennes de stress. Rec. Méd. Vét. 164, 723 – 741.
20. Möstl, E., Palme, R. (2002) Hormones as indicators of stress. Domest Anim Endocrinol 23, 67-74.
21. Muirhead, M. R. (1981) Blood sampling in pigs. Techniques in practice 3, 16-20.
22. Pavičić, Z., Vučemilo, M., Tofant, A., Hađina, S. (2003) Cortisol level in the blood plasma of pigs immediately before and after transport. XIth International Congress in Animal Hygiene. Mexico, City Autonomus Metropolitan University, 23-27 February 2003.
23. Razdan, P. (2003) Stress and early pregnancy in sows: effect on endocrinology, ova transport and embryo development. Doctoral dissertation. ISSN 1401-6257, ISBN 91-576-6377-7.
24. Spencer, G. S. C. (1979) Circadian variation of somatomedin and cortisol in pigs. Horm. Metab. Res., 11, 586.
25. Spencer, G. S. C. (1980) Relationship between plasma somatomedin activity and levels of cortisol and free fatty acids following stress in pigs. J. Endocrinol. (G.B.), 84, 109-114.
26. Trottier, N. L., Shipley, C. F., Easter, R. A. (2014) A technique for the venous cannulation of the mammary gland in the lactating sow. Journal of animal science 73, 1390-1395.
27. Turner, C. (1952) The anatomy of the mammary gland of swine. In: The mammary gland I. The Anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers, Columbia, MO. pp. 279-314.
28. Van der Staay, F. J., Schuurman, T., Hulst, M., Smits, M., Prickaerts, J., Kenis, G., Korte, S. M. (2010) Effects of chronic stress: A comparison between tethered and loose sows. Physiology & Behavior 100, 154–164.
29. Zimmerman, J. J., Karriker, L. A., Ramirez, A., Schwartz, K. J., Stevenson, G. W. (2012) Herd evaluation. In Diseases of swine, 10th edition. John Wiley & Sons, Inc. Wiley-Blackwell. pp. 15-16.

STUDIO SUL COMPORTAMENTO DEI SUINETTI IN SALA PARTO VERSO I CUPS DURANTE LA LATTAZIONE

A STUDY ON PIGLETS BEHAVIUOR IN FARROWING ROOM TOWARD CUPS DURING LACTATION

ROMANO G.[1], SCOLLO A.[1], BALDI G.[2], TAGLIAFERRI L.[1], RIGHI F.[3], BRESCIANI C.[3], MAZZONI C.[1]

[1] Suivet, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; [2] Mazzoleni, Via dell'Artigianato 77/81, 24055 Cologno al Serio (BG), Italia; [3] Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, 43121 Parma, Italia.

Parole chiave: suinetti in lattazione, latte supplementare, comportamento
Key words: suckling piglets, supplementary milk, behaviour

RIASSUNTO
L'attenzione dell'industria suinicola di oggi è rivolta allo svezzamento di un alto numero di suinetti, a patto che questi abbiano raggiunto un giusto peso. Ciò è possibile sia grazie all'avvento delle nuove genetiche iperprolifiche che all'impiego di nuove strategie in grado di aiutare la scrofa a nutrire adeguatamente il surplus di suinetti, come l'aggiunta di latte supplementare all'interno di specifici abbeveratoi (i cups). Nidiate molto numerose, infatti, implicano una maggiore disomogeneità di gruppo, con una più alta percentuale di suinetti leggeri e un minor peso totale allo svezzamento, rendendo così indispensabile l'intervento di metodi aggiuntivi di allattamento.
Il nostro studio valuta, attraverso l'osservazione del comportamento dei suinetti in sala parto, quali attingono maggiormente ai cups e come questi si accrescono rispetto ai fratelli che non ne fanno utilizzo. I risultati ottenuti identificano i suinetti più leggeri come i maggiori consumatori di latte supplementare e come i maggiori consumatori di pasti in generale, attingendo sia dalla madre che dai cups. Ciò ha determinato una maggiore crescita, in termini di peso, di questi soggetti rispetto ai fratelli nati più pesanti, aumentando così l'omogeneità di gruppo allo svezzamento e le entrate economiche dell'allevatore.

ABSTRACT
Swine industry, today, aims to wean a high number of heavy piglets. This is possible thanks to the advent of new hyperprolific genetics and to the use of new strategies able to help the sow to adequately feed the surplus of piglets, such as the addition of supplementary milk inside specific drinking troughs (= cups). Supplementary milk is critical for large litters, because the latter imply a group inhomogeneity, with a higher percentage of light piglets and a lower total weaning weight.
In our study we observed the piglets behaviour in farrowing room to evaluate which ones drink from cups and how they grow compared to the siblings who don't use them. Results indicate that lighter piglets drink more supplementary milk and make more meals, feeding from both mother and cups. This resulted in a greater weight of the light piglets than the heavier siblings born, thus increasing group homogeneity at weaning and the farmer's income.

INTRODUZIONE
Aumentare le dimensioni delle nidiate è stato per lungo tempo un obbiettivo dell'industria suinicola, che ha portato alla selezione di linee genetiche iperprolifiche in grado di dare alla

luce un gran numero di suinetti (Sandøe et al., 2012). In contemporanea, aumenta anche la preoccupazione per la salute e il benessere di queste nidiate allargate e la gestione di un numero così alto di suinetti diventa una sfida per l'allevatore (Pustal et al., 2015). La crescita del suinetto dalla nascita allo svezzamento rappresenta infatti una fase delicata per l'industria suinicola e questo progresso biologico nella produzione di suinetti (> 14 nati vivi) si traduce purtroppo in un minor peso alla nascita della nidiata (Feller, 2010), in un aumento della percentuale di suinetti nati leggeri (< 1,0 kg) e in un aumento della disomogeneità di gruppo (Novotni-Dankó et al., 2015). I suinetti con un basso peso alla nascita cresceranno più lentamente rispetto ai fratelli più pesanti e questa disomogeneità, se portata fino allo svezzamento, inficerà negativamente sulla produttività dell'allevamento (Novotni-Dankó et al., 2015). Diversi studi, come quello effettuato da Mahan e Lepine (1991), dimostrano infatti che il peso allo svezzamento rappresenta un indice importante delle prestazioni complessive di un allevamento e, se si vuole ottenere una buona entrata economica, è necessario che questo sia competitivo sul mercato. Difatti, oggigiorno, non è importante solo il numero di suinetti svezzati, bensì anche il loro peso, il quale dipende, inevitabilmente, dalla produzione di latte da parte della madre (Lewis et al., 1978).

Con l'avvento delle genetiche iperprolifiche il numero di capezzoli e la produzione di latte non sono sempre sufficienti ad assicurare il giusto nutrimento all'intera nidiata (Baumann et al., 2012). Sebbene la produzione di latte aumenti in base alla richiesta dei suinetti (Algers e Jensen, 1985), l'eiezione da parte della scrofa raggiunge di solito un massimo individuale, che, negli ultimi decenni, non è cresciuto in maniera proporzionale al numero di suinetti nati vivi e, di conseguenza, la quantità effettiva di latte per suinetto è diminuita (King, 2000). Il minor apporto di colostro e latte porta ad effetti negativi sui suinetti, come l'aumento della mortalità in lattazione (Vasdal et al., 2011) e un minore incremento ponderale giornaliero medio pre-svezzamento (Auldist et al., 1998). Per far fronte a questa situazione, gli allevatori hanno adottato diverse strategie, come l'utilizzo di scrofe di balie od anche l'impiego di sistemi di allattamento artificiali, che somministrano latte supplementare, meglio se erogato all'interno di specifici contenitori quali i cups. Secondo Ha et al. (2011), fornire la giusta formulazione di latte supplementare può aumentare l'apporto di nutrienti ai suinetti, con conseguente aumento di peso degli stessi.

La bibliografia in nostro possesso (Azain et al., 1996; Miller et al., 2012; Pustal et al., 2015; Baumann et al., 2012; Novotni-Dankó et al., 2015), riguardante studi sull'utilizzo del latte supplementare in sala parto, riporta sempre un confronto tra gruppi trattati (con il supplemento) e gruppi controllo (senza supplemento), cosa che invece non è avvenuta per il nostro studio. L'obbiettivo che ci siamo preposti, infatti, è stato di valutare, all'interno di gruppi aventi tutti una supplementazione di latte distribuita tramite cups, se i suinetti che attingevano ai cups si alimentavano in ugual maniera anche dalla madre e viceversa, e se questi hanno avuto un maggiore o, al contrario, un minore incremento di peso. Dato il basso numero di soggetti preso in esame, consideriamo il nostro lavoro come uno studio preliminare, in modo da gettare le basi per future ricerche.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in un allevamento intensivo sito nella provincia di Brescia (Italia), il cui stato sanitario è considerato "convenzionale" e, più nel dettaglio per quanto attiene alla sola PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*), stabile-inattivo al momento della prova. L'allevamento è costituito da una scrofaia, che è organizzata in banda settimanale e alloggia circa 2000 scrofe di genetica danese (Dan Bred International®, Denmark), e da uno svezzamento, che è situato ad una distanza di circa 5 km e in cui vengono trasferiti i suinetti in seguito all'allontanamento dalla madre. Il management aziendale segue

le procedure operative standard (SOPs) per quanto riguarda le vaccinazioni, l'accasamento, la pulizia, la gestione dei rifiuti e le misure di biosicurezza. Le scrofe ricevono un'alimentazione ti tipo liquido sia in gestazione che in lattazione, ma nel primo caso l'alimento è distribuito in modo automatico mentre nel secondo caso in modo semiautomatico. La temperatura delle stanze è mantenuta tra i 20 ed i 23°C ed è presente un sistema di ventilazione a pressione negativa oltre che un sistema di raffrescamento, tipo cooler, operativo durante i mesi più caldi dell'anno.

Lo studio è stato condotto tra maggio e giugno 2018 e ha avuto la durata di una singola banda, dalla nascita dei suinetti fino al loro svezzamento, che è avvenuto a 25 giorni di età. Per la prova sono state coinvolte 6 scrofe pluripare (scrofette e balie sono state escluse), con una media di 3° parto, e relative nidiate, per un totale di 85 suinetti. Ciascuna scrofa disponeva di una scheda appositamente ideata per la prova, in cui sono stati inseriti tutti i dati relativi al parto: ordine di parto, data del parto, nati vivi, nati morti, mummificati e spostati per il pareggiamento. Sulla stessa scheda sono stati anche annotati tutti gli eventi accaduti durante la lattazione, in particolare le cause di decesso dei suinetti (schiacciamento, sottopeso, scarto, diarrea, streptococco, castrazioni o ernie con esito negativo), il numero di soggetti tolti o aggiunti, perché spostati sotto un'altra scrofa o ricevuti da un'altra scrofa, i trattamenti effettuati sia sulla scrofa che sui suinetti e il numero di svezzati. Questi dati sono stati raccolti per dare uno spessore maggiore all'analisi statistica, con particolare riguardo alla mortalità riscontrata.

Le scrofe sono state selezionate casualmente all'interno di 4 sale parto contenenti ciascuna 10 gabbie parto di tipo convenzionale, con condizioni ambientali e manageriali identiche. All'interno di ogni gabbia parto era presente un cups che erogava il latte supplementare grazie alla presenza di un circuito che attraversava le sale parto al di sotto delle gabbie stesse. Il latte è stato diluito in una proporzione di 150 g di latte in polvere in 1 litro di acqua ed è stato miscelato alla temperatura di circa 30-35°C, per arrivare all'interno dei cups intorno ai 22-25°C. La lunghezza dell'impianto di distribuzione era di circa 1 chilometro, ma erano presenti delle stazioni lungo il percorso che riprendevano il riscaldamento del latte, in modo da mantenere adeguata la temperatura durante l'intero tragitto. Il latte è stato somministrato ad libitum a partire dal secondo giorno di vita fino allo svezzamento.

Per la prova, sono state scelte le scrofe che avevano partorito da almeno 18-24 ore, in modo che le nidiate fossero già pareggiate a 14-15 suinetti, e, contestualmente a questa selezione, è avvenuta anche la prima pesatura, che è stata eseguita individualmente con singola identificazione dei soggetti mediante l'apposizione di navette auricolari numerate. Gli stessi suinetti sono stati pesati nuovamente a metà lattazione (15 giorni) e a fine lattazione (25 giorni), appena prima dello svezzamento; le pesate sono state eseguite in maniera individuale allo scopo di evidenziare la crescita di ciascun singolo suinetto e rapportarla all'utilizzo o meno dei cups. A tal proposito, sono state apposte 4 telecamere, in modo che riprendessero dall'alto e per intero le 6 nidiate, al fine di osservare il comportamento dei suinetti in relazione alla presenza dei cups (Figura 1).

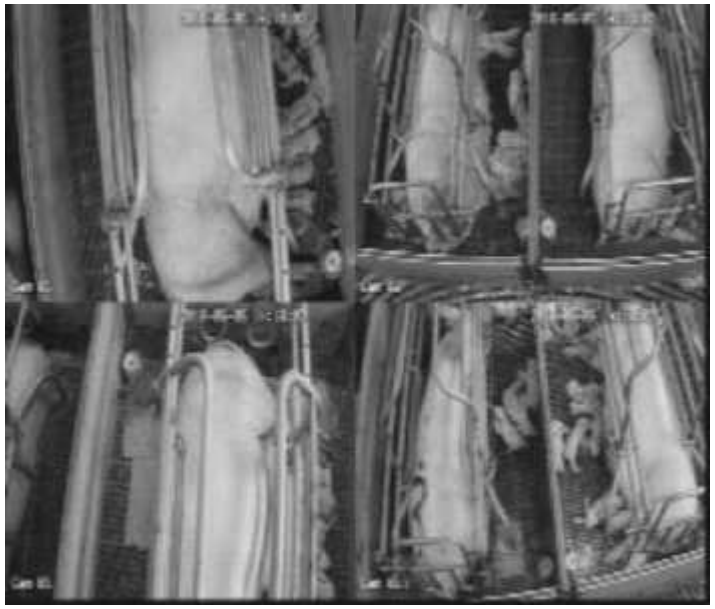


Figura 1. Visione dalle quattro telecamere che riprendono le sei scrofe e relative nidiate dall'alto.
Figure 1. Vision from the four cameras that capture the six sows and related litters from above.

Le telecamere sono state accese ad 8 e a 15 giorni di vita e, in queste due occasioni, tutti i suinetti sono stati ulteriormente numerati sulla schiena mediante un apposito pennarello nero, allo scopo di avere una corrispondenza con le navette auricolari e associare le pesate del singolo suinetto con il suo comportamento. Le telecamere sono state accese al mattino e spente al pomeriggio, in modo da riprendere un periodo minimo di 4 ore. In un secondo momento le registrazioni sono state revisionate, prendendo, come punto di partenza per l'osservazione comportamentale, il momento in cui tutti i suinetti erano a riposo. In particolare, la prima osservazione (8° giorno) ha preso in considerazione la fascia oraria dalle 14:12 alle 18:12, mentre la seconda (15° giorno) dalle 13:40 alle 17:40. Nello specifico, è stato segnato il numero di volte in cui lo stesso suinetto andava ad alimentarsi dalla madre piuttosto che dal cups, ricavando da questo dato quanti e quali suinetti hanno più o meno utilizzato i cups e quanti pasti totali (mamma + cups) sono stati fatti da ogni singolo suinetto. Va precisato che, se uno stesso suinetto si attaccava alla madre (o al cups), si staccava per un breve periodo di tempo e si riattaccava poco dopo, il pasto è stato considerato come fatto due volte.

Analisi statistica
L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software IBM SPSS versione 25 e la procedura ANOVA univariata. Il fattore fisso è stato l'utilizzo o il non utilizzo dei cups, mentre le variabili sono state il peso prima e dopo le osservazioni e il numero di pasti.

RISULTATI
L'Analisi statistica ha rilevato che i suinetti che fanno uso dei cups a 8 giorni di vita sono significativamente più leggeri degli altri, confrontati al primo giorno di vita (1,16 kg *vs* 1,30 kg; P=0.037). Gli stessi soggetti, però, risultano essere tendenzialmente più pesanti a 15 giorni di vita (3,74 kg *vs* 3,31 kg P=0.066) e fanno un numero significativamente più alto di pasti (P<

0.001), poiché attingono sia dalla madre che dai cups.
I suinetti che fanno uso dei cups a 15 giorni di vita, invece, non differiscono per peso rispetto agli altri suinetti di 15 giorni (3,65 kg *vs* 3,34; P=0.170), ma fanno un numero di pasti significativamente più alto (P=0.011) e sono significativamente più pesanti a 25 giorni di vita (5,63 kg *vs* 4,92; P=0.016).
Nel Grafico 1 è illustrato l'andamento di crescita dei suinetti durante la lattazione, differenziando quelli che hanno fatto utilizzo dei cups da quelli che non ne hanno fatto utilizzo, rendendo evidente quanto appena detto.

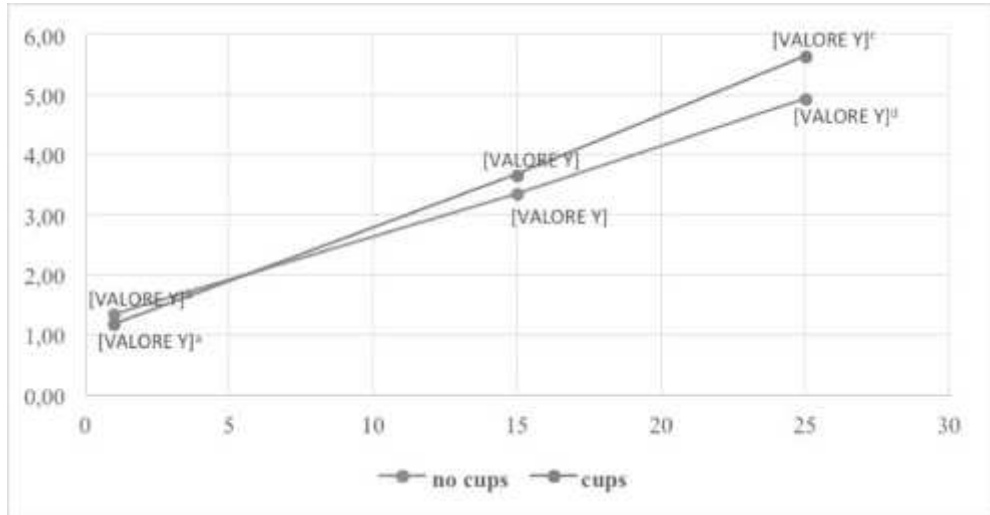


Grafico 1. Accrescimento dei suinetti in funzione dell'età e dell'utilizzo dei cups. Sull'asse delle ascisse è riportata l'età (gg) dei soggetti, mentre sull'asse delle ordinate è indicato il loro peso (kg). I dati con lettere minuscole diverse (a, b, c e d) sono differenti (P<0.05)
Graphic 1. *Piglets growing according to age and cups use. The age (gg) is shown on the abscissae axis, while the weight (kg) is indicated on the ordinate axis. Data with different lowercase letters (a, b, c and d) are different (P <0.05).*

Dall'analisi delle schede utilizzate per la prova, è stato possibile estrapolare la mortalità avuta durante la lattazione all'interno del gruppo di studio. In particolare, sono stati 5 i suinetti morti, rappresentando quindi un 5,88% di mortalità totale, anche se dalle schede è emerso che tutti i soggetti sono deceduti in seguito ad episodi di diarrea (Tabella 1). Due suinetti su 85, invece, sono stati tolti e spostati sotto un'altra scrofa prima dello svezzamento, ma non è stata specificata la causa di tale spostamento (Tabella 1).

Vivi	Morti per diarrea	Tolti
85	5	2
100%	5,88%	2,35%

Tabella 1. Numero di suinetti vivi, morti per diarrea e tolti, espressi sia in forma numerica che in percentuale.
Table 1. *Number of live piglets, dead due to diarrhoea and removed, expressed in numerical form and as percentage.*

DISCUSSIONE

Le scrofe di genetica iperprolifica producono molti più suinetti di quanti ne potrebbero allattare (Boulot et al., 2008). Con una produzione di latte media per scrofa di 8-10 kg al giorno e un consumo massimo per suinetto di 1-1,3 kg al giorno (Kirchgeßne et al., 2008), la quantità di latte non è più sufficiente per fornire il giusto nutrimento a tutti componenti della nidiata (Baumann et al., 2012). Inoltre, quando le dimensioni della nidiata superano il numero di capezzoli funzionanti, non tutti i suinetti saranno in grado di assicurarsi la propria fonte di alimentazione, rischiando di morire di fame a causa della competizione con i fratelli e dell'inadeguato allattamento (Andersen et al., 2011). In particolare, saranno i suinetti più leggeri e deboli che non riusciranno a far proprio alcun capezzolo: questi intraprenderanno una dura lotta con i fratelli più pesanti e forti, con grande dispendio di energia, per assicurarsi un posto, ma, non riuscendoci le prime volte, rimarranno esclusi per tutte le poppate successive, facendo tentativi di alimentarsi invano. Secondo Baumann et al. (2012), i suinetti che non hanno conquistato alcun capezzolo tenderanno a prendere peso più lentamente rispetto agli altri, impiegando più giorni a raggiungere lo stesso peso di svezzamento dei fratelli più pesanti (Novotni-Dankó et al., 2015). Viceversa, questi ultimi saranno in grado di attingere più latte dalla madre e cresceranno più velocemente rispetto ai fratelli senza capezzolo (King et al., 1997; Mitchell et al., 2012; Quiniou et al., 2002). Secondo Novotni-Dankó et al. (2015), più del 17% dei suinetti sotto 1,0 kg di peso muore entro le prime 24 ore di vita. Per evitare questa mortalità precoce, le nidiate dovrebbero essere pareggiate entro un giorno dal parto in modo che il numero dei suinetti non superi il numero massimo di capezzoli funzionanti (Manon et al., 2017), ma, con l'avvento delle genetiche iperprolifiche, ciò diventa molto complicato (Baumann et al., 2012). Sono diverse le strategie adottate dagli allevatori per allattare, in maniera adeguata, un'eccedenza di suinetti trascorse le 24 ore dal parto e di solito si basano sul cross-fostering, o allattamento parziale (Edwards e Baxter, 2015; Kirkden et al., 2014), sull'utilizzo di balie (Pustal et al., 2015) e sulla somministrazione di latte supplementare (Baxter et al., 2013; Miller et al., 2012; Knoop, 2009).

Il nostro studio ha voluto esaminare il comportamento dei suinetti presso un allevamento di scrofe iperprolifiche (Danbred) in cui utilizzano il latte supplementare, erogato all'interno di cups, come supporto all'allattamento materno. L'analisi delle osservazioni comportamentali ha rilevato che i cups sono stati ben accettati dai suinetti, in particolare da quelli con uno scarso peso iniziale di partenza. Ciò fa presupporre che i soggetti con un minor peso alla nascita siano quelli con più esigenza di nutrirsi in modo artificiale, poiché non riescono a vincere la competizione per il capezzolo con i fratelli più pesanti e rimangono sprovvisti di latte. Dal nostro studio, inoltre, è stato evidenziato che questi suinetti fanno un numero maggiore di pasti poiché, in realtà, attingono sia dai cups che dalla madre. Infatti, è stato possibile apprezzare dai video che, nel momento in cui i suinetti venivano chiamati dalla madre a mangiare, quelli che non erano riusciti fino a quel momento ad impossessarsi di alcun capezzolo, andavano ad attingere direttamente dai cups (Figura 2, a sinistra). Quando i suinetti più grossi erano in momento di riposo, i suinetti che di solito bevevano dai cups cercavano di alimentarsi dalla madre (Figura 2, a destra), con risultati spesso deludenti sotto il profilo della quantità di ingestione, dal momento che la fase di eiezione lattea della scrofa era ormai terminata. Questo comportamento è stato osservato sia ad 8 che a 15 giorni di lattazione.

Figura 2. Immagini ricavate dai video comportamentali. A sinistra, un suinetto attinge dai cups mentre i fratelli si alimentano dalla madre (osservazione a 8 giorni di età). A destra, tre suinetti tentano di alimentarsi dalla madre mentre i fratelli riposano (osservazione a 15 giorni di età).

Figure 2. *Images taken from behavioural videos. On the left, a piglet drinks from cups while the sibling feed from the mother (observation at 8 days of age). On the right, three piglets try to feed from the mother while the sibling rest (observation at 15 days of age).*

Tutto ciò conferma quanto già analizzato in precedenza da Baumann et al. (2012), i quali hanno constatato, sempre tramite osservazioni video, che i suinetti che non riescono a impossessarsi di un proprio capezzolo sono i primi a cercare il latte supplementare e ciò si manifesta dopo alcuni tentativi falliti, di nutrirsi dalla madre. Gli stessi autori hanno anche constatato che, al richiamo dei suinetti per l'inizio della poppata, quelli che non avevano identificato alcun capezzolo andavano direttamente a bere il latte supplementare, confermando quanto riscontrato nel nostro studio.

Differenti autori (Azain et al., 1996; Miller et al., 2012; Novotni-Dankó et al., 2015) hanno trovato differenze significative per quanto riguarda il peso individuale dei suinetti allo svezzamento, confrontando nidiate cresciute con un supplemento di latte e nidiate cresciute senza. Dai dati estrapolati dal nostro studio non è possibile effettuare considerazioni simili, in quanto non disponiamo di un gruppo controllo per un eventuale confronto. Tuttavia, dai risultati ottenuti è possibile avvalorare l'ipotesi che i soggetti più bisognosi di aiuto nei primi giorni di vita facciano ricorso ai cups, consentendo loro di recuperare lo scarso peso iniziale e, addirittura, di diventare i più pesanti del gruppo allo svezzamento, continuando ad alimentarsi sia dalla madre che dai cups. È quindi plausibile pensare che il latte supplementare rappresenti un importante strumento per quei suinetti che, in assenza di tale aiuto, rimarrebbero scarti all'interno del gruppo o, probabilmente, andrebbero incontro a inedia e morte nei primi giorni di vita. Quanto riscontrato nel nostro studio si ripercuote anche su una maggiore omogeneità del gruppo, aumentando così il peso totale della nidiata allo svezzamento e portando maggiori vantaggi economici all'allevatore, come dimostrato anche da Novotni-Dankó et al. (2015). A tal proposito, studi precedenti (Gondret et al., 2005; King et al., 1997; Vaclavkova et al., 2012; Wolter et al., 2002) hanno rilevato una correlazione fortemente positiva tra il peso allo svezzamento e la crescita dei suinetti post-svezzamento, suggerendo l'esistenza di considerevoli vantaggi economici nel portare allo svezzamento suinetti con un peso maggiore.

Inoltre, Pustal et al. (2015) non hanno trovato differenze significative in quanto mortalità ed

episodi di diarrea tra i suinetti cresciuti con supplemento di latte e suinetti cresciuti senza, mentre Novotni-Dankó et al. (2015) hanno dimostrato risultati positivi a favore dei suinetti alimentati con supplemento di latte. Poiché il nostro studio non ha messo a confronto un gruppo con supplemento e un gruppo senza, l'unica riflessione che possiamo fare in merito alla mortalità nel nostro gruppo di studio è che si è mantenuta al di sotto del 10-15%, valore considerato accettabile in sala parto (Marchant et al., 2000), essendo stata del 5,88% e riportata solo in seguito ad episodi di diarrea. Anche se Dewey et al. (1995) hanno riportato un aumento dei casi di diarrea in seguito all'uso di latte supplementare, a causa di una ridotta assunzione del latte materno, a nostro avviso la mortalità per diarrea non si è dimostrata essere un valore zootecnicamente preoccupante. La percentuale di suinetti tolti e spostati sotto un'altra scrofa (2,35%) non è stata calcolata nella mortalità totale pre-svezzamento, poiché non siamo a conoscenza del destino di quei suinetti sotto la nuova madre.
Infine, diversi studi (Azain et al.,1996; Knecht et al., 2015) riportano che l'assunzione del latte supplementare da parte dei suinetti cambia in base alla stagione (calda o fredda). Poiché la produzione di latte da parte delle scrofe diminuisce con le alte temperature (Baumann, 2011; Renaudeau e Noblet, 2001), i suinetti sembrano compensare questo deficit materno assumendo una maggior quantità di latte supplementare e rimediando alla perdita di peso che avrebbero avuto in assenza di tale supplemento (Azain et al.,1996). Poiché il nostro studio è stato affrontato per una sola banda, in assenza di un gruppo controllo negativo e in clima primaverile, non ci è possibile confermare o smentire quanto detto dagli autori precedenti; per questo motivo il comportamento dei suinetti verso l'utilizzo o meno dei cups rispetto alla stagionalità è sicuramente un argomento da approfondire in future ricerche.

CONCLUSIONI

Grazie a questo studio è stato possibile evincere che l'utilizzo dei cups, che forniscono latte supplementare in aiuto od in parziale sostituzione del latte materno, rappresentano un importante strumento per far crescere in maniera omogenea un gran numero di suinetti all'interno della stessa nidiata. Il peso della nidiata allo svezzamento sarà quindi sicuramente maggiore, grazie al contributo di quei suinetti che, senza il latte supplementare, sarebbero rimasti scarti all'interno del gruppo, non disponendo di alcun capezzolo di riferimento per alimentarsi. Tutto ciò si traduce in una maggiore entrata economica per l'allevatore, che potrà svezzare nidiate più omogenee e, presumibilmente, più pesanti. Ulteriori studi sono comunque necessari per approfondire meglio il comportamento dei suinetti nei confronti dei cups in sala parto, con particolare riguardo alla stagionalità.

Ringraziamenti:
Un ringraziamento particolare alla Famiglia Cremaschini (Bompiano di Zurlengo-BS) per aver messo a disposizione l'allevamento sede della prova e la Mazzoleni SpA (Cappella Cantone-CR) per aver supportato la sperimentazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Algers B., Jensen P. (1985) "Communication during suckling in the domestic pig - effects of continuous noise". Appl Anim Behaviour Sci. 14:49–61
2. Auldist D., Morrish L., Eason P., King R. (1998) "The influence of litter size on milk production of sows". Animal Sci. 67:333–7
3. Azain M., Tomkins T., Sowinski J., Arentson R., Jewell D. (1996) "Effect of supplemental pig milk replacer on litter performance: seasonal variation in response". J Animal Sci. 74:2195–202
4. Baumann S. (2011) "Automatische Milchbeifütterung von Saugferkeln Teil 1: Gesundheits- und Leistungsmerkmale der Sauen und Ferkel". Landesanstalt für Schweinezucht Boxberg: Report, p. 1–3
5. Baumann S., Sonntag S., Gallmann E., Jungbluth T. (2012) "Investigations into automatic feeding of suckling piglets with supplemental milk replacer". Landtechnik 67, no. 1, pp. 51–54
6. Baxter E. M., Rutherford K. M. D., D'Eath R. B., Arnott G., Turner S. P., Sandøe P., Moustsen V. A., Thorup F., Edwards S. A., Lawrence A. B. (2013) "The welfare implications of large litter size in the domestic pig II: management factors". Anim Welf. 22:219–38
7. Boulot S., Quesnel H., Quiniou N. (2008) "Management of high prolificacy in French herds : can we alleviate side effects on piglet survival?" Advance in Pork Production. 19:213–20
8. Dewey C. E., Wittum T. E., Hurd H. S., Dargatz D., Hill G. W. (1995) "Herd-and litter-level factors associated with the incidence of diarrhea morbidity and mortality in piglets 4–14 days of age". Swine Health Prod. 3:105–12
9. Edwards S. A., Baxter E. M. (2015) "Piglet mortality: causes and prevention. In: Farmer C, editor. The gestating and lactating sow". The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, p. 253–78
10. Feller B. (2010) "Bau- und Haltungstechnik zur mutterlosen Aufzucht (Landwirtschaftskammer Nordrhein-Westfalen). http://www.landwirtschaftskammer.com/duesse/lehrschau/pdf/2010/2010-01-07-wuerfe-0pdf
11. Gondret F., Lefaucheur L., Louveau I., Lebret B. (2005) "The longterm influences of birth weight on muscle characteristics and eating meat quality in pigs individually reared and fed during fattening". Arch. Anim. Breed., 48, 68–73
12. Ha D. M., Jang K. S., Won H. S., Ha S. H., Park M. J., Kim S. (2011) "Effects of creep feed and milk replacer and nursery phase-feeding programs on pre- and post-weaning growth of pigs". Han'gug Dongmul Jawon Gwahag Hoeji 53:333–9
13. King R. H. (2000) "Factors that influence milk production in well-fed sows". J Animal Sci. 78:19–25
14. King R. H., Mullan B. P., Dunshea F. R., Dove H. (1997) "The influence of piglet body weight on milk production of sows". Livest. Prod. Sci. 47, 169–174
15. Kirchgeßner, M.; Roth, R. X.; Schwarz, F. J.; Stangl, G. I. (2008): Tierernährung. Frankfurt am Main, DLG Verlag GmbH, 12. Aufl
16. Kirkden R. D., Broom D. M., Andersen I. L. (2014) "INVITED REVIEW: Piglet mortality: Management solutions". J Anim Sci. 91:3361–89
17. Knecht D., Srodon S., Duziuski K. (2015) "The impact of season, parity and breed on selected reproductive performance parameters of sows". Arch. Anim. Breed. 58, 49–56
18. Knoop S. (2009) "Einsatz von Ferkelammen". Bildungs- und Wissenszentrum Boxberg, Newsletter, Juni 2009
19. Mahan D. C., Lepine A. J. (1991) "Effect of pig weaning weight and associated nursery feeding programs on subsequent performance to 105 kilograms body weight". J. Anim. Sci. 69:1370
20. Manon A. M. H., Tijs J. T., Manon M. C. H. (2017) "The effect of double nursing, an alternative nursing strategy for the hyper-prolific sow herd, on herd performance". Porcine Health Management 3:2
21. Marchant J. N., Rudd A. R., Mendl M. T., Broom D. M., Meredith M. J., Corning S., Simmins P. H. (2000) "Timing and causes of piglet mortality in alternative and conventional farrowing systems". The Veterinary Record 147, 209 214
22. Miller Y. J., Collins A. M., Smits R. J., Thomson P. C., Holyoake P. K. (2012) "Providing

supplemental milk to piglets preweaning improves the growth but not survival of gilt progeny compared with sow progeny. J Animal Sci. 90:5078–85
23. Mitchell A. D., Ramsay T. G., Caperna T. J., Scholz A. M. (2012) "Body composition of piglets exhibiting different growth rates". Arch. Anim. Breed. 55, 356–363
24. Novotni-Dankó G., Balogh P., Huzsvai L., Gyori Z. (2015) "Effect of feeding liquid milk supplement on litter performances and on sow back-fat thickness change during the suckling period". Arch. Anim. Breed., 58, 229–235
25. Pustal J., Traulsen I., Preißler R., Müller K., Beilage T., Börries U., Kemper N. (2015) "Providing supplementary, artificial milk for large litters during lactation: effects on performance and health of sows and piglets: a case study". Porcine Health Management 1:13
26. Quiniou N., Dagorn J., Gaudre D. (2002) "Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance". Livest. Prod. Sci. 78, 63–70
27. Renaudeau D., Noblet J. (2001) "Effects of exposure to high ambient temperature and dietary protein level on sow milk production and performance of piglets". J Animal Sci. 79:1540–8
28. Sandøe P., Rutherford K., Berg P. (2012) "Large litter sizes – ethical challenges and ways of dealing with them in future breeding and management". Bruges, Belgium: Proceedings of the 4th European Symposium of Porcine Health Management p. 74–6
29. Vaclavkova E., Danek P., Rozkot M. (2012) "The influence of piglet birth weight on growth performance". Res. Pig Breed. 6, 59–61
30. Vasdal G., Ostensen I., Melisova M., Bozdechova B., Illmann G., Andersen I. (2011) "Management routines at the time of farrowing-effects on teat success and postnatal piglet mortality from loose housed sows". Livestock Sci. 136:225–31
31. Wolter B. F., Ellis M., Corrigan B. P., DeDecker J. M. (2002) "The effect of birth weight and feeding of supplemental milk replacer to piglets during lactation on pre-weaning and post-weaning growth performance and carcass characteristics". J. Anim. Sci. 80, 301–308

PERICARDITE FIBRINOSA AL MACELLO: PREVALENZA NEL SUINO PESANTE E RELAZIONE CON LE ALTRE LESIONI DELLA CORATA

FIBRINOUS PERICARDITIS AT SLAUGHTERHOUSE: PREVALENCE ON HEAVY PIGS AND RELATIONSHIP WITH OTHER PLUCK LESIONS

BOTTACINI M.[1, 2], SCOLLO A.[2,3], CONTIERO B.[1], GOTTARDO F.[1]

[1]Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova; [2]Suivet, Reggio Emilia, Italia; [3]Swivet Research, Reggio Emilia, Italia;

Parole chiave: pericardite fibrinosa, pleurite, macello
***Key words*:** fibrinous pericarditis, pleuritis, slaughterhouse

RIASSUNTO
La pericardite nel suino è una lesione difficilmente riconducibile ad una sintomatologia specifica, ma può compromettere la salute dell'animale e verosimilmente determinare delle ricadute economiche. Con questo studio si è voluta analizzare la prevalenza al macello di pericardite fibrinosa in suini di 170 kg, mettendola in relazione con la prevalenza di altre lesioni alla corata. Durante un periodo di 12 mesi, le corate di 57'943 suini pesanti provenienti da 236 allevamenti intensivi del Nord Italia sono state monitorate per la presenza di pericardite fibrinosa, pleurite, polmonite e lesioni parassitarie al fegato. Il 5.66% delle corate è risultato positivo per pericardite, collocandosi coerentemente rispetto ai valori precedentemente riportati sul suino leggero. La mancanza di un effetto stagionale e la variabilità attribuibile all'allevamento di provenienza sottolineano come la prevalenza di questa lesione sia fortemente legata a fattori aziendali. Il 49% delle corate con pericardite è stato interessato da una concomitante pleurite grave, evidenziando una stretta relazione tra queste lesioni ($r^2 = 0.59$). Nonostante la correlazione con i valori di polmonite sia risultata sensibilmente inferiore ($r^2 = 0.16$), la presenza di questa lesione ha comunque determinato un aumento del rischio di una concomitante pericardite, evidenziando come, oltre a quella con la pleurite, possano esistere diverse relazioni patogenetiche tra le lesioni alla corata.

ABSTRACT
Pericarditis in reared pigs is a lesion not referable to specific symptoms, affecting animal health with possible economic losses. The aim of the present study was to analyse the prevalence of fibrinous pericarditis on heavy pigs (170 kg) at slaughterhouse, relating it to other pluck lesions. During a 12-month sampling period, 57'943 plucks from heavy pigs reared in intensive farm from Northern Italy were monitored for pericarditis, pleuritis, pneumonia and parasitic lesions on livers. A prevalence of 5.66% of fibrinous pericarditis was recorded, a value in accordance with previous results on pigs slaughtered at 120 Kg. Season didn't played any significant role, while the farm of origin accounted for 38.4% of variation, suggesting how pericarditis prevalence could be linked to farm factors. 49% of plucks with a recorded pericarditis had a simultaneous severe pleuritis, showing a strong association between these lesions ($r^2 = 0.59$). Despite a lower correlation with pneumonia ($r^2 = 0.16$), this lesion increased the risk of a simultaneous pericarditis at pluck level, highlighting how, beyond the link with pleuritis, different pathogenic relations among different pluck lesions could exist.

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di pericardite nel suino, con la produzione di diverse tipologie di essudato, può derivare dalla disseminazione batterica per via ematogena, come pure dall'estensione per via linfatica dell'infiammazione da organi adiacenti come i polmoni e le pleure (Loynachan A.T., 2012). Batteri, virus o una qualsiasi alterazione cardio-circolatoria che causi un'essudazione e la deposizione di fibrina possono essere coinvolti nello sviluppo di questa lesione.

Oltre ad incidere negativamente sul benessere animale a causa del dolore toracico, la presenza di essudati e di fibrina rappresentano l'esito di uno stato patologico difficile da valutare in termini di prevalenza aziendale e che come le altre lesioni sulla corata può determinare perdite economiche durante il ciclo di ingrasso. Un'eventuale alterazione cardio-circolatoria legata alla pericardite potrebbe rappresentare un fattore di rischio per il decorso di diverse patologie che incidono sulla perfusione e/o sull'ossigenazione dei tessuti, aggravando ad esempio quadri patologici con coinvolgimento respiratorio. L'assenza di una sintomatologia specifica rende di fatto il rilievo post-mortem l'unica strada per quantificare la problematica in allevamento. È in questo contesto che il rilievo al macello si configura come uno strumento fondamentale per valutare la prevalenza aziendale di pericardite e l'associazione con le altre lesioni sulla corata, integrando le informazioni derivanti dalle necroscopie in allevamento.

La presenza di pericardite fibrinosa nei cuori esaminati al macello, non rappresenta di per se un rischio per il consumatore, ma può risultare nello scarto dell'organo o in un suo declassamento a sottoprodotto, determinando una perdita economica diretta. Durante l'ispezione delle corate al macello, la lacerazione e l'incompletezza del sacco pericardico a causa del processo di eviscerazione rende impossibile la valutazione di eventuali essudati: la presenza di fibrina sull'epicardio è dunque l'unico reperto visibile nella maggior parte dei casi, limitando la sensibilità ispettiva alle lesioni croniche. La prevalenza di pericardite fibrinosa registrata al macello in studi precedenti, nonostante una certa variabilità tra i risultati, si attesta su valori mediamente al di sotto del 10%, ad eccezione del 13% rilevato da Buttenschoen (1991): si va dal 2.3% di Mathur et al. (2018) al 9% di Bonde et al. (2010), con valori medi vicini al 5% (Madec and Kobish, 1982; Mousing et al., 1995). L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza di pericardite fibrinosa al macello in suini pesanti, e di verificare l'associazione di tale patologia con altre lesioni della corata. La stagione di macellazione e l'allevamento di provenienza sono stati entrambi considerati per meglio spiegare la variabilità complessiva.

MATERIALE E METODI

Da gennaio a dicembre 2017 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 corate di 658 lotti (circa 90 suini per lotto) provenienti da 236 allevamenti, per un totale di 57'943 corate. Due veterinari, attraverso l'ispezione visiva e palpazione, si sono alternati nel monitoraggio dei lotti per garantire l'attendibilità nei punteggi durante tutta la giornata di macellazione. I punteggi di ogni corata sono stati registrati tramite un registratore vocale e poi trascritti in un file Excel.

La presenza o assenza di pericardite fibrinosa è stata stabilita valutando la presenza o meno di fibrina sulla superfice dell'epicardio. La presenza di pleurite è stata classificata secondo il metodo utilizzato da Dottori et al. (2007), mentre ogni lobo polmonare (escluso quello accessorio) è stato valutato per presenza ed estensione di polmonite enzootica, secondo la griglia di Madec et Derrien (1981). La concomitante presenza di cicatrici, consolidamenti, ascessi, sequestri, lesioni con *pattern* a scacchiera è stata anch'essa annotata. Per il punteggio delle lesioni parassitarie sui fegati, attribuibili alla migrazione larvale degli ascaridi, è stata adottata la griglia a tre valori (1-3) utilizzata da Scollo et al. (2017).

Per tutti i lotti (n=658), le variabili considerate avevano distribuzione normale e sono state elaborate mediante analisi della varianza con modello misto (PROC MIXED di SAS) comprendente l'effetto della stagione di macellazione e della classe di prevalenza di pericardite (prevalenza medio-bassa *vs* alta): la selezione della soglia del 7.78% (riferito alla percentuale di corate con pericardite nel lotto) corrisponde al terzo quartile. La variazione legata all'allevamento di provenienza è stata inserita come effetto *random*. La correlazione tra le diverse lesioni è stata verificata utilizzando il test di *Spearman*. Considerando la bassa prevalenza attesa di pericardite fibrinosa, i dati per l'associazione di frequenza sono stati analizzati utilizzando come unità campionaria la corata (n=57'943) anziché il lotto.

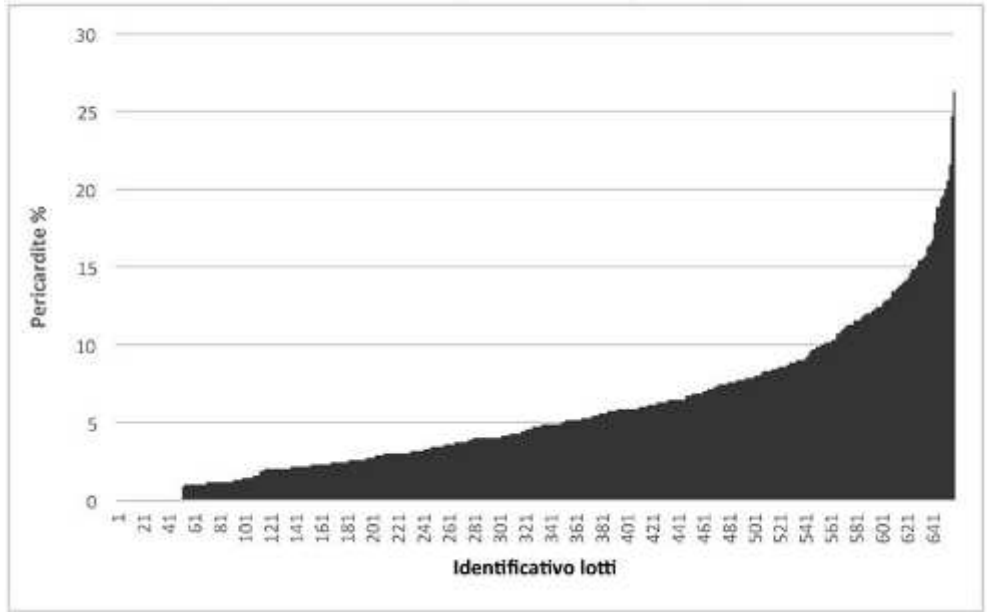
RISULTATI E DISCUSSIONE

Il 5.66% di corate con pericardite fibrinosa registrato nel presente studio (mediana di lotto = 4.71%) è una prevalenza che si avvicina alla media dei valori precedentemente riportati in altre pubblicazioni internazionali sul suino leggero, evidenziando come per il suino pesante italiano non sembrano esistere differenze significative. Nonostante questo valore sia relativamente contenuto se confrontato con la prevalenza di altre lesioni sulla corata, alcuni lotti sono risultati particolarmente problematici, con valori superiori al 15% (Fig.1). L'allevamento di provenienza ha influito significativamente sulla variabilità dei lotti monitorati, giustificando il 38.4% della variabilità totale. È quindi evidente quanto i fattori aziendali, a partire dalla gestione, risultino decisivi nel determinare la prevalenza di pericardite al macello. Pratiche chirurgiche come la castrazione sono state riportate ad esempio come fattori di rischio, determinando prevalenze di pericardite più elevate negli animali castrati rispetto ai maschi interi e alle femmine (Mathur et al., 2018). Nonostante in Italia la castrazione venga praticata di routine, non è emersa una prevalenza superiore a quella registrata in Paesi dove non è pratica comune ridimensionando in parte il peso relativo di questo fattore di rischio. Questa e le altre pratiche chirurgiche andrebbero tuttavia prese in considerazione nell'analisi di prevalenze sopra alla media, per le quali potrebbe essere necessario rivedere il rispetto delle misure igienico-sanitarie. Mathur et al. (2018) hanno riportato inoltre come anche la genetica possa influire sullo sviluppo di questa lesione, riscontrando un coefficiente di ereditarietà di 0.14.

Figura 1

Distribuzione in ordine crescente dei lotti monitorati (n = 658) secondo la percentuale di corate con pericardite fibrinosa.

All the monitored batches (n = 658) are distributed in ascending order according to the percentage of plucks with fibrinous pericarditis.



La mancanza di un effetto della stagione di macellazione sulla prevalenza di pericardite, a differenza di quanto riscontrato per le altre lesioni sulla corata (Scollo et al., 2017), suggerisce come questa sia influenzata per lo più da fattori che non subiscono variazioni significative durante l'anno solare, confermando l'importanza di fattori strettamente aziendali.

La cronicità di questa lesione (data la presenza di fibrina organizzata) e la mancanza di variazioni stagionali aumentano la probabilità che l'inizio della patogenesi possa risalire alle prime fasi di allevamento, nelle quali, grazie al microclima controllato (con particolare riferimento alla temperatura), le variazioni climatiche stagionali esercitano un effetto inferiore rispetto agli ambienti privi di sistemi di condizionamento. La datazione della lesione a queste fasi potrebbe dunque risultare associata a patogeni tipici del settore svezzamento, anche se mancano informazioni anamnestiche per escludere che possa risalire ad altre fasi del ciclo.

Prendendo in esame le altre lesioni sulla corata, l'appartenenza alla classe di pericardite con prevalenza uguale o superiore al terzo quartile (7.78%) ha determinato un aumento significativo sia dei valori di pleurite che di polmonite e delle lesioni gravi al fegato (Tab.1). Un'elevata prevalenza di pericardite a livello di lotto è risultata dunque predittiva di un'elevata prevalenza di lesioni alla corata, seppure con differenze lesione-specifiche: lotti di suini ad elevata prevalenza di pericardite potrebbero indicare, al di là di eventuali connessioni patogenetiche, una maggiore recettività di quegli animali a diversi tipi di infezione rispetto a quelli con prevalenza di pericardite medio-bassa. La correlazione positiva (r^2= 0.59) tra la percentuale di corate con pericardite e quella di corate con pleurite grave (punteggi 3 e 4) conferma la correlazione riscontrata da Mathur et al. (2018), confermando la stretta relazione patogenetica tra queste lesioni.

Tabella 1

Prevalenza di diverse lesioni sulla corata in 658 lotti di suini pesanti espressa come medie minime quadratiche, corrette per l'effetto dell'allevamento di provenienza. I lotti campionati sono rappresentati divisi in due gruppi, stabiliti secondo la soglia di corate con pericardite fibrinosa corrispondente al terzo quartile (7.78%).

Prevalence of different pluck lesions in 658 batches of heavy pigs as LS-means, corrected for farm effect. Batches are grouped in two cathegories for fibrinous pericarditis prevalence, established according to the third quartile threshold (7.78%).

n = 658	Media tra i lotti		SEM	*P*-value	Effetto allevamento (%)
	Classe di prevalenza per pericardite				
	medio-bassa < 7.78 %	elevata ≥ 7.78 %			
Cuore					
Pericardite (%)	3.6	11.7	0.2	<0.001	17.7
Pleure					
Punt. 0 (%)	70.0	63.7	1.3	<0.001	68.1
Punt. 1 (%)	7.8	8.4	0.4	0.152	25.9
Punt. 2 (%)	12.3	13.8	0.7	0.033	58.8
Punt. 3 (%)	7.5	9.7	0.5	<0.001	49.3
Punt. 4 (%)	2.4	5.3	0.2	<0.001	23.5
Polmoni					
Punteggio medio	1.1	1.3	0.1	0.008	46.4
Cicatrici (%)	10.6	12.7	0.4	<0.001	26.9
Fegato					
Lesioni gravi (%)	20.5	22.3	0.9	0.049	55.4

SEM: errore standard della media

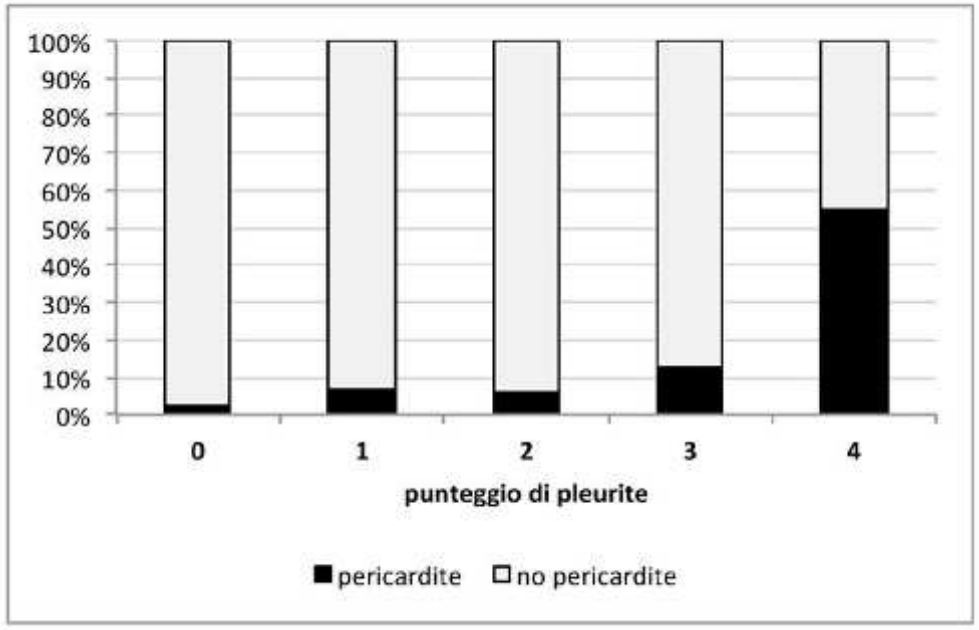
SEM: standard error of the mean

A livello di corata l'associazione di frequenza ha confermato questa relazione tra le due lesioni(Fig.2), dal momento che il 49% delle corate con pericardite è risultata avere una concomitante pleurite grave (punteggio 3 e 4). Questi risultati sembrano supportare l'ipotesi patogenetica secondo cui l'estensione dell'infiammazione pleurica possa coinvolgere il pericardio, anche se la presenza di pericardite in assenza di pleurite in una percentuale significativa dei casi lascia comunque aperta la discussione sull'origine primaria della lesione.

Figura 2.

Tutte le corate monitorate (n = 57943) sono raggruppate secondo ogni punteggio di pleurite (n punt. 0 = 38169; n punt. 1 = 4852; n punt. 2 = 8179; n punt. 3 = 5000; n punt. 4 = 1743), per i quali le corate con pericardite fibrinosa sono espresse in percentuale.

All the monitored plucks (n = 57943) are grouped for every pleuritis score (n score 0 = 38169; n score 1 = 4852; n score 2 = 8179; n score 3 = 5000; n score 4 = 1743) with the relative percentage of plucks with fibrinous pericarditis.



Nonostante la bassa correlazione positiva tra la percentuale di pericardite e il valore medio di polmonite ($r^2 = 0.16$) a livello di lotto, un valore di polmonite sulla singola corata uguale o superiore a 2 (terzo quartile) e la presenza dei suoi esiti cicatriziali hanno determinato un aumento del rischio per la presenza di una concomitante pericardite (Tab.2)

L'agente eziologico della polmonite enzootica (*M. hyopneumoniae*) non sembra quindi coinvolto in modo diretto nello sviluppo di pericardite, anche se il ruolo di patogeno "apri-porta" per altri microorganismi potrebbe risultare verosimile (vista la sua epidemiologia) nei casi di pericardite sviluppata tardivamente nel ciclo di ingrasso. È lecito supporre anche che uno o più patogeni in grado di determinare lo sviluppo pericardite, possano avere determinato lesioni polmonari che, seppur lievi, potrebbero aver favorito l'aggravarsi del quadro complessivo di polmonite rilevato al macello. Questi risultati non sembrano però sufficienti per affermare che patogeni strettamente legati allo sviluppo di polmonite possano essere normalmente coinvolti nella patogenesi della pericardite. Nonostante *M. hyopneumoniae* sia stato riportato come il batterio più frequentemente isolato dal pericardio (Buttenschoen, 1997), i presenti risultati sembrano parzialmente discolpare questo agente infettivo, orientando i sospetti diagnostici verso patogeni maggiormente legati allo sviluppo di pleurite, che stando alle lesioni riscontrate risultano i più frequentemente coinvolti nello sviluppo primario o secondario di pericardite.

Tabella 2

Lesioni rilevate su 57943 corate, espresse come fattori di rischio per la compresenza di pericardite fibrinosa. Il rapporto di rischio è stato calcolato partendo dalle percentuali di corate con pericardite nelle classi di lesioni selezionate.

Lesions monitored on 57943 plucks, expressed as risk factors for fibrinous pericarditis presence. The risk ratio has been obtained from the percentage of plucks with fibrinous pericarditis within the selected lesion classes.

n = 57943	Corate con pericardite (%)	*P*-value	RR	95% CI	
punt. pleurite > 0	12.2	<0.001	5.4	5.0	5.8
punt. pleurite = 0	2.3				
punt. pleurite 3+4	23.8	<0.001	7.3	6.8	7.8
punt. pleurite 0+1+2	3.3				
punt. medio polmonite ≥ 2	6.1	<0.001	1.2	1.1	1.3
punt. medio polmonite < 2	5				
presenza di cicatrici	7	<0.001	1.3	1.1	1.4
assenza di cicatrici	5.5				

RR: rapporto di rischio — CI: intervallo di confidenza

RR: risk ratio — *CI: confidence interval*

CONCLUSIONI

Questi risultati indicano che un ciclo di ingrasso fino a 170 kg non sembra aumentare la prevalenza di pericardite fibrinosa rispetto a quanto riportato nel suino leggero, suggerendo come questa lesione possa risalire nella maggior parte dei casi a fasi precedenti al raggiungimento di 120 kg. La mancanza di un effetto stagionale e la notevole variabilità tra allevamenti suggerisce come variabili maggiormente legate all'animale e alla singola azienda possano fare la differenza come determinanti nella prevalenza di pericardite. La correlazione positiva con gli stadi più gravi di pleurite conferma la stretta relazione tra le due lesioni: l'origine primaria concomitante (a causa dei medesimi patogeni) o lo sviluppo secondario di pericardite a causa dell'estensione infiammatoria a partire dalle pleure sembrano i due sviluppi patogenetici più frequenti. Nonostante la presenza di polmonite e dei suoi esiti cicatriziali aumentino il rischio di rilevare una concomitante pericardite, questi risultati pongono in secondo piano il ruolo patogenetico di *M. hyopneumoniae*, contrapponendosi all'elevata frequenza relativa di isolamento da liquido pericardico (Buttenschoen, 1997).

La contestualizzazione dei risultati al macello per le diverse lesioni, integrata all'anamnesi aziendale, può fornire informazioni importanti per l'interpretazione e la successiva gestione dei problemi sanitari in allevamento, contribuendo ad orientare il sospetto eziologico a seconda della prevalenza relativa e della compresenza di queste lesioni.

BIBLIOGRAFIA

1. Loynachan A.T., 2012. Cardiovascular and hematopoietic systems. In: Diseases of Swine, Tenth edn John Wiley & Sons Gottschalk Inc., pp. 189-198.
2. Buttenschoen J., 1991: Statistical evidence for a link between bronchopneumonia and disseminated focal nephritis in pigs. J. Vet. Med. A38, 287-299.
3. Mathur P.K., Vogelzang R., Mulder H.A.,Knol E.K., 2018. Genetic selection to enhance animal welfare using meat inspection data from slaughter plants. Animals 2018, 8, 16.
4. Bonde M., Toft N., Thomsen P.T., Sørensen J.T., 2010. Evaluation of sensitivity and specificity of routine meat inspection of Danish slaughter pigs using latent class analysis. Prev. Vet. Med. 2010, 94, 165–169.
5. Madec F. and Kobisch M., 1982. A survey of pulmonary lesions in bacon pigs (observations made at the slaughterhouse). journee Recherche porc. France, 1982,341.
6. Mousing J., Willeberg P., Kyrval J., Petersen J.V., 1995. The Horsens Project. A comparative study of visual and traditional meat inspection procedures in slaughter pigs. Dansk Veterinaertidsskrift, 78(7), 345–350.
7. 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.
8. Madec F., Derrien H., 1981. Fréquence, intensité et localization des lesions pulmonaires chez le porc charcutier: résultats d'une première série d'observations en abattoir. Journées de la Recherche Porcine en France 13,231–236.
9. 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 170 kg (heavy pigs). Preventive Veterinary Medicine. 2017; 144: 20–28
10. Buttenschoen J., Friis N.F., Aalbaek B., Jensen T.K., Iburg T., Mousing J., 1997. Microbiology and pathology of fibrinous pericarditis in Danish slaughter pigs. Zentralbl. Veterinarmed. A 44, 271–280.

ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO (ESBL) IN CINGHIALI E SUINI IN SVEZZAMENTO ED INGRASSO DECEDUTI CON E SENZA SINTOMATOLOGIA ENTERICA

EXTENDED-SPECTRUM B-*LACTAMASES-PRODUCING ESCHERICHIA COLI (ESBL) IN WILD BOARS AND WEANING AND FATTENING DISEASED PIGS WITH AND WITHOUT DIARRHEA*

BALDO V.[1], PITOZZI A.[1], BONIOTTI M.B.[1], SALOGNI C.[1], GIOVANNINI S.[1], SCALI F.[1], AGNOLETTI F.[2], MAZZOLINI E.[2], PASQUALI P.[3], ALBORALI G.L.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna;*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie;*
[3] *Istituto Superiore di Sanità.*

Parole Chiave: *E. coli*, antibiotico resistenza, ESBL ,suini, cinghiali
***Key Words*:** *E. coli*, antimicrobial resistance, ESBL, pigs, wild boars

RIASSUNTO

Questo studio si propone di investigare la prevalenza e le caratteristiche molecolari di ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) produttori di Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) isolati da suini allevati nelle categorie svezzamento ed ingrasso e deceduti con sintomatologia enterica e non enterica e da cinghiali vissuti in ambiente naturale. Nel 2018 sono stati raccolti 1109 ceppi di *E. coli*, di cui 522 sono stati identificati come *E. coli* con fenotipo che produce ESBL. 215 *E. coli* produttori di ESBL sono stati testati mediante PCR e tutti sono stati confermati. I 215 ceppi di *E. coli* produttori di ESBL sono stati ulteriormente suddivisi in base al gruppo filogenetico ed al pattern di resistenza genica. I ceppi di *E. coli* produttori di ESBL hanno presentato un diverso tipo di β-lattamasi, con bla_{CTX-M} nell'89.4% dei suini con sintomatologia enterica e 84.3% nei suini non enterici mentre nei cinghiali la prevalenza è stata dell'87.9%. bla_{SHV} è stato trovato nel 6% di suini sia con sintomatologia enterica che non enterica mentre 1.5% nei cinghiali, bla_{TEM} 63.6% e 69.9% nei suini enterici e non enterici e bla_{CMY} è stato rilevato nel 12.1%, 13.3% e 9.1% rispettivamente suini enterici, non enterici e cinghiali. I dati ottenuti evidenziano che nei cinghiali la prevalenza di *E. coli* ESBL produttori è inferiore a quanto rilevato nei suini. Nonostante ciò la presenza del 14% di *E. coli* ESBL produttori mette comunque in evidenza un significativo ruolo dell'ambiente nella diffusione dell'antibiotico resistenza.

ABSTRACT

The aims of this study was to investigate the prevalence and molecular characteristics of *Escherichia coli* Extended-Spectrum β-Lactamases (ESBL) producers isolated from pigs reared in the weaning and fattening categories, dead with enteric and non-enteric symptoms or isolated from hunted wild boars. During 2018 a total of 1109 *E. coli* isolates were collected. Of those, 522 *E. coli* were identified as ESBL-producing phenotype. 215 ESBL producers were tested by PCR confirming ESBL genotype. These were further grouped according to phylogenetic background and genetic relatedness. *E. coli* ESBL producers harbored different β-lactamases, with bla_{CTX-M} in 89.4% pigs with enteric diseased and

84.3% non enteric diseased while 87.9% in wild boars. bla_{SHV} was detected in 6% of pigs while 1.5% of wild boars, bla_{TEM} in 63.6% and 69.9% of enteric and non enteric diseased pigs and bla_{CMY} in 12.1%, 13.3% and 9.1% of enteric, non enteric pigs and wild boars respectively. These data suggest that the prevalence of ESBL *E. coli* in wild boars is less than in pigs. Although a significant percentage of ESBL *E. coli* producers highlights a significant role of the environment in the spread of the antimicrobial resistance.

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza (AMR) è un problema di rilevanza mondiale con una valenza "One Health" che sta sempre più coinvolgendo oltre all'uomo e agli animali anche l'ambiente (Wasyl D. *et al*., 2018). Numerosi sono i microrganismi che concorrono a rendere complesso il problema della resistenza agli antimicrobici e, fra questi, i ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) produttori di β-lattamasi a spettro esteso (ESBL). *E. coli* è un microrganismo commensale, ubiquitario e patogeno responsabile di infezioni intestinali ed extraintestinali in animali e uomini. E' riconosciuto che i ceppi commensali e patogeni sono in grado di condividere lo stesso ambiente (Wu *et al*., 2013). Le cefalosporine sono ritenute un trattamento efficace anche nei confronti di patogeni gram-negativi ed in particolare delle infezioni causate da *E. coli* multi-resistenti (Sanchez S. J. *et al*., 2013). Negli ultimi anni la resistenza alle β-lattamasi, ed in particolare alle cefalosporine di terza e quarta generazione, è notevolmente aumentata diventando un importante problema di sanità pubblica (Agersø e Aarestrup, 2013). Uno dei più preoccupanti segnali è rappresentato dall'emergenza delle extended-spectrum β-lactamases (ESBL) in grado di inattivare β-lattamici quali cefalosporine di terza, quarta generazione e aztreonam (Liu *et al*., 2015). Inoltre in microrganismi ESBL produttori è stata osservata l'associata resistenza ad antimicrobici non β-lattamici quali fluorochinoloni, aminoglicosidi, e sulfonamidi spesso usati anche per il trattamento di patogeni nell'allevamento suino (Tian *et al*., 2009, Tian *et al*.,2012; Yuan *et al*., 2009).

L'aumento della prevalenza di *E. coli* produttori di ESBL, oltre a rende sempre più difficile il controllo delle patologie nel suino, si pone come un serio problema di sanità pubblica. Gli animali allevati per la produzione di alimenti possono rappresentare un reservoir per microrganismi resistenti agli antimicrobici quali *E. coli* ESBL produttori che, attraverso la catena alimentare o il contatto diretto, possono contribuire alla diffusione o al mantenimento dell'AMR nell'ambiente e in ambito umano. Tuttavia è riconosciuto che i microrganismi ESBL produttori sono presenti anche in animali da compagnia, animali degli zoo e animali selvatici. Fra questi ultimi il cinghiale rappresenta uno degli indicatori più importanti per valutare la pressione selettiva che l'ambiente subisce e la sua esposizione a geni di resistenza trasmessi da microrganismi di origine animale ed umana (Dahms C. *et al*., 2015).

Lo scopo del presente studio è di valutare la prevalenza e le caratteristiche molecolari di *E. coli* produttori di ESBL isolati da cinghiali vissuti in ambiente naturale e da suini di diverse età allevati e deceduti con sintomatologia enterica e non enterica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio è stato attuato nel 2018 su un totale di 1109 ceppi di *E. coli* isolati da suini in

svezzamento ed ingrasso deceduti in presenza (314) e in assenza (336) di sintomatologia clinica enterica e da cinghiali abbattuti durante la stagione di caccia (459). I campioni di feci o contenuto intestinale sono stati sottoposti ad indagini batteriologiche e di biologia molecolare al fine di evidenziare la presenza di ceppi di *E. coli* ESBL produttori e di procedere alla caratterizzazione fenotipica e genotipica.

Prelievo, stoccaggio e trasporto al laboratorio dei campioni

I campioni di feci o contenuto intestinale da sottoporre a tale prova, una volta prelevati secondo le modalità previste da standards internazionali [e.g. EN ISO 707:2008 (IDF 50: 2008)], sono stati conservati a 2-8°C e trasportati entro 24 ore al laboratorio. I campioni sono stati sottoposti ad isolamento, identificazione ed in parte a determinazione del gruppo filogenetico e dei geni di resistenza.

Isolamento ed identificazione di *E. coli* produttori di ESBL o AmpC

La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata secondo un procedimento che prevede una fase di pre-arricchimento, seguita da isolamento selettivo, subcoltura, identificazione e stoccaggio dei ceppi *E. coli* ESBL fenotipo positivo.

La prima fase di pre-arricchimento consiste nel mettere a contatto un'aliquota del materiale con acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10. Dopo aver incubato il campione a 37±1°C per 18-22 ore viene eseguito un trapianto su una piastra di agar MacConkey addizionato di 1 mg/L di cefotaxime (McCC) per garantire l'isolamento di colonie singole di *E. coli* produttore di ESBL o AmpC.

Sulla base della colorazione e delle caratteristiche morfologiche sono state selezionate le colonie sospette di *E. coli* produttori di ESBL/AmpC (EUCAST, WHO, 2014).

Gruppo filogenetico e geni di resistenza

Una percentuale significativa dei ceppi di *E. coli* risultati ESBL fenotipo positivo è stata sottoposta alla caratterizzazione molecolare. A tal fine, una singola colonia batterica per campione è stata risospesa in 250µl di acqua DNase-Rnase free e il DNA è stato estratto attraverso lisi-bollitura (98°C per 10minuti).

Lo schema analitico seguito per caratterizzare ciascun campione ha previsto come step iniziale l'identificazione del gruppo filogenetico attraverso una PCR multiplex (Clermont O. *et al.*, 2013).

Il rilevamento dei geni di resistenza presenti è stato eseguito tramite un pannello di reazioni PCR. Una PCR multipla è stata utilizzata per l'identificazione dei geni del gruppo CTX-M la cui positività, singola o multipla, identifica i 4 principali gruppi CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 e CTX-M8/25 (Woodford N. *et al*., 2006). Singole reazioni PCR sono state utilizzate per l'identificazione del gene SHV (Arlet G. *et al*., 1997), per il gene TEM (Mabilat C. *et al*., 1990) e per il gene AmpC di tipo plasmidico CMY-2 (Dierilkx C. *et al*., 2010).

Analisi Statistica

La significatività statistica relativa alla distribuzione dei diversi gruppi filogenetici e dei geni di resistenza nelle tre categorie di animali (suini con sintomatologia enterica, suini con sintomatologia non enterica e cinghiali) è stata valutata con il test esatto del chi-quadrato.

RISULTATI

Dei 1109 campioni testati per la ricerca del fenotipo ESBL, 522 ceppi di *E. coli* hanno espresso il fenotipo per ESBL.

Nei suini con sintomatologia enterica 208 su 314 nei suini con sintomatologia non enterica 248 su 336 mentre nei cinghiali 66 su 459 hanno espresso fenotipo caratteristico per ESBL.

I risultati della caratterizzazione fenotipica sono riportati nella Tabella 1. Sono stati isolati ceppi di *E. coli* produttori di ESBL nel 73.8% dei campioni di contenuto intestinale o feci prelevati in suini con sintomatologia non enterica, nel 66.2% dei campioni provenienti da suini con sintomatologia enterica e 14.4% degli isolati provenienti da cinghiali.

Dei 522 campioni risultati positivi per il fenotipo ESBL, 215 sono stati processati in PCR per la conferma delle caratteristiche filogenetiche e dei geni di resistenza. La presenza di geni di resistenza è stata evidenziata in tutti i 215 ceppi isolati e risultati positivi alle indagini di screening fenotipico batteriologico.

Tab. 1 – Caratterizzazione fenotipica di ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati da suini con sintomatologia enterica e non e da cinghiali. I numeri con diverso numero di asterischi sono statisticamente differenti.

Tab. 1 – Phenotype of *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars. The numbers with different number of asterisks are statically different.

SPECIE E CATEGORIA ANIMALE	*E.coli* TESTATI PER FENOTIPO ESBL	N° CEPPI (%)CON FENOTIPO POSITIVO
SUINI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA	314	208 (66,2)*
SUINI CON SINTOMATOLOGIA NON ENTERICA	336	248 (73,8)**
CINGHIALI	459	66 (14.4)***
TOTALE	1109	522

Dei 208 ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini deceduti con sintomatologia enterica 140 provenivano da animali in svezzamento e 68 da suini all'ingrasso. Dei 248 ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini deceduti con sintomatologia non enterica 199 provenivano da animali in svezzamento e 49 da suini all'ingrasso (Tabella2).

Tab. 2 – Caratterizzazione fenotipica di ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini allevati in svezzamento ed ingrasso con sintomatologia enterica e non. I numeri con diverso numero di asterischi sono statisticamente differenti.

Tab. 2 – Phenotype of *E. coli* ESBL isolated from diseased pigs of different age with and without enteric disease The numbers with different number of asterisks are statically different.

SPECIE E CATEGORIA ANIMALE		*E. coli* TESTATI PER FENOTIPO ESBL	N° CEPPI (%) CON FENOTIPO POSITIVO
SUINI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA (N°=314)	SVEZZAMENTO	210	140 (66.7)*
	INGRASSO	104	68 (65.4)*
SUINI CON SINTOMATOLOGIA NON ENTERICA (N° =336)	SVEZZAMENTO	258	199 (77.1)**
	INGRASSO	78	49 (62.8)*

I gruppi filogenetici testati (A, B1, B2, C, D, E, F) sono stati tutti evidenziati sia nei suini che nei cinghiali.

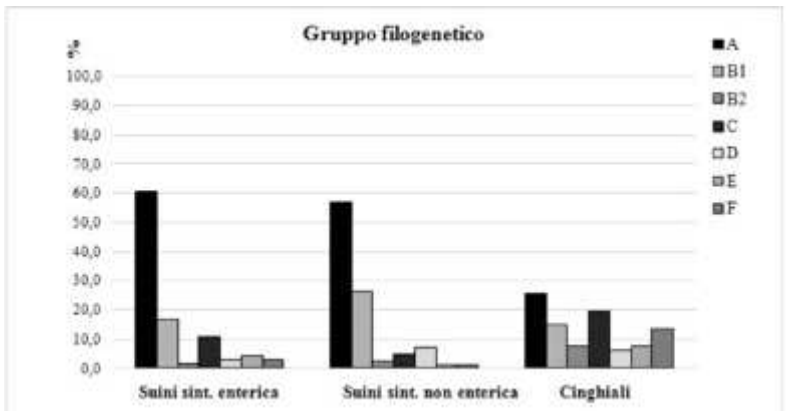
Nella Figura 1 vengono riportati i risultati dell'analisi del gruppo filogenetico che ha evidenziato che il gruppo filogenetico predominante è A sia nei suini con sintomatologia non enterica (56.6%), sia nei suini con sintomatologia non enterica (60.6%) che nei cinghiali (25.8%).

Nei suini con sintomatologia enterica esso è seguito da B1 (16.7%), C (10.6%), E (4.5%), D (3.0%), F (3.0%) e B2 (1.5%) mentre nei suini con sintomatologia non enterica da B1(26.5%), D (7.2%), C (4.8%), B2 (2.4%), E (1.2%) e F (1.2%).

Nei cinghiali il gruppo filogenetico C (19.7%) precede in ordine B1 (15.2%), F (13.6%), B2 (7.6%), E (7.6%) e D (6.1%).

Fig. 1 – Gruppi filogenetici di *E. coli* ESBL isolati da suini con e senza sintomatologia enterica e da cinghiali.

Fig. 1 – Phylogenetic groups of *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars.



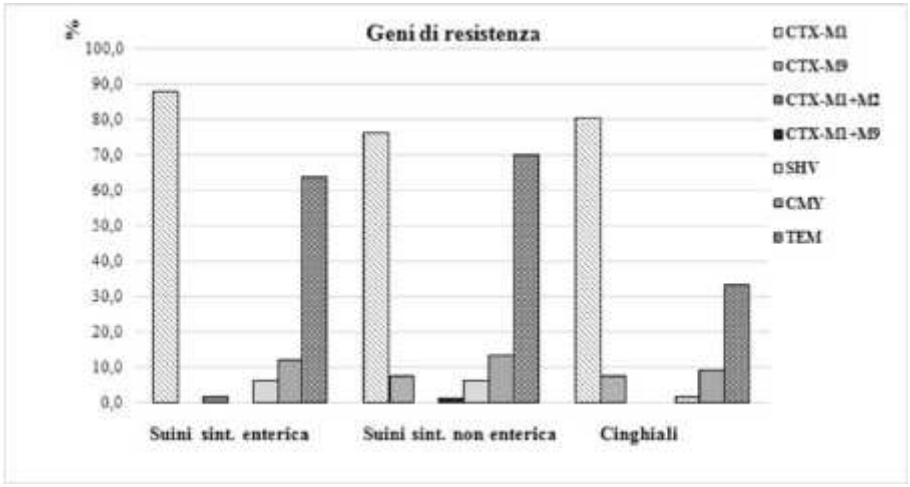
Dall'analisi molecolare sono stati rilevati i geni di resistenza CTX-M, SHV, CMY e TEM la cui frequenza è riportata in Figura 2.

Nei suini con sintomatologia enterica sono stati evidenziati CTX-M1 (87.9%), TEM (63.6%), CMY (12.1%) e SHV (6.1%). Inoltre in un solo campione è stata evidenziata la presenza della combinazione CTX-M1+M2.

Nei suini con sintomatologia non enterica i geni prevalenti sono CTX-M1 (75.9%) e TEM (69.9%); a seguire CMY (13.3%), CTX-M9 (7.2%) e SHV (6.0%). Solo in un campione è stata evidenziata la presenza della combinazione CTX-M1+M9.

Nei cinghiali sono stati osservati i geni CTX-M1 (80.3%) e TEM (33.3%) seguiti dai geni CMY (9.1.%), CTX-M9 (7.6%) e da un solo caso di presenza del gene SHV (1.5%).

Fig. 2 – Caratterizzazione genotipica e geni di resistenza in *E. coli* ESBL isolati da suini con e senza sintomatologia enterica e da cinghiali.
Fig. 2 – Molecular characterization and genes *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La prevalenza di *E. coli* ESBL produttori isolati in animali produttori di alimenti è in continuo aumento in tutto il mondo (Liebana *et al*., 2013). Il presente lavoro rappresenta un contributo per lo studio della prevalenza e la caratterizzazione di *E. coli* produttori di ESBL isolati in suini e cinghiali.
Il 47% degli isolati sottoposti a caratterizzazione fenotipica sono risultati essere ESBL produttori. La prevalenza di *E. coli* ESBL produttori si è dimostrata significativamente più elevata nei suini rispetto ai cinghiali. Fra i suini allevati in svezzamento ed ingrasso la prevalenza è risultata maggiore negli animali deceduti con sintomatologia non enterica rispetto a quelli deceduti con sintomatologia enterica. Negli svezzati con sintomatologia enterica la prevalenza è pressoché identica a quella riscontrata negli ingrassi. Nei suini con sintomatologia non enterica la prevalenza è leggermente superiore negli svezzati rispetto agli ingrassi.

L'analisi dei gruppi filogenetici condotta sui 215 ceppi di *E. coli* ESBL produttori ha dimostrato che i gruppi filogenetici presente nei suini sono gli stessi indipendentemente dalla categoria produttiva e dalla sintomatologia clinica. Nel complesso il gruppo A è risultato prevalere sugli altri gruppi in entrambe le specie.
Pur essendo stati ottenuti gli stessi gruppi filogenetici, nei cinghiali è stato possibile notare differenze rispetto ai suini nella distribuzione dei ceppi. Nella fattispecie si evidenzia nei cinghiali una maggior prevalenza dei gruppi C ed F ed una minore prevalenza del gruppo A.
L'analisi molecolare dei geni di resistenza ha evidenziato la maggior prevalenza complessiva di CTX-M1 e di TEM in entrambe le specie.
Quanto ottenuto è in linea con la letteratura europea in merito alla prevalenza dei gruppi filogenetici e dei geni di resistenza nelle diverse specie (Poeta P. *et al.*, 2009; Wasyl D. *et al*., 2018).
L'elevata prevalenza di *E. coli* ESBL produttori in suini deceduti per patologie enteriche e non enteriche rende sempre più importante ed attuale l'utilizzo di protocolli terapeutici razionali in allevamento. La presenza di geni di resistenza comuni in ceppi di *E. coli* produttori di ESBL isolati in suini allevati ed in cinghiali mette in evidenza un reale rischio di AMR anche in animali non sottoposti a trattamenti farmacologici quali i cinghiali. Ciò enfatizza l'importanza di un costante monitoraggio al fine di conoscere la dinamica di diffusione dei geni di AMR tra animali, uomo ed ambiente ivi comprese le specie selvatiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu. G., Day. M. J., Mafura. M. T., Nunez-Garcia. J., Fenner. J. J., Sharma. M. *et al*. (2013). "Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK". The Netherlands and Germany. *PLoS ONE* 8:e75392. doi: 10.1371/journal.pone.0075392
2. Silva Sanchez. J., Cruz-Trujillo. E., Barrios. H., Reyna-Flores. F., Sanchez Perez. A. Bacterial Resistance C. *et al*. (2013). "Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico". *PLoS ONE* 8:e77968. doi: 10.1371/journal.pone.0077968
3. Agersø. Y. and Aarestrup. F. M. (2013). "Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs". *J. Antimicrob. Chemother.* 68. 569-572. doi: 10.1093/jac/dks427
4. Tian. G. B., Wang. H. N., Zhang. A. Y., Zhang. Y., Fan. W. Q., Xu. C. W., *et al*. (2012). "Detection of clinically important beta-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China". *J. Med. Microbiol.* 61. 233-238. doi: 10.1099/jmm.0.036806-0
5. Tian. G. B., Wang. H. N., Zou. L. K., Tang. J. N., Zhao. Y. W., Ye. M. Y. *et al*. (2009). "Detection of CTX-M-15. CTX-M-22. and SHV-2 extended- spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China". *Foodborne Pathog. Dis.* 6. 297-304. doi: 10.1089/fpd.20 08.0164
6. Liu. X., Boothe. D. M., Thungrat. K. and Aly. S. (2012). "Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals". *Vet. Microbiol.* 161. 159-168. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.019
7. Yuan. L., Liu. J. H., Hu. G. Z., Pan. Y. S., Liu. Z. M., Mo. J. *et al*. (2009). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase- producing *Escherichia coli* isolates

from chickens in Henan Province. China. *J. Med. Microbiol.* 58. 1449–1453. doi: 10.1099/jmm.0.012 229-0
8. Liebana. E., Carattoli. A., Coque. T. M., Hasman. H., Magiorakos. A. P., Mevius. D. *et al*. (2013). "Public health risks of *Enterobacterial* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or ampC beta-lactamases in food and food-producing animals: An EU perspective of epidemiology. analytical methods. risk factors. and control options". *Clin. Infect. Dis.* 56. 1030-1037. doi: 10.1093/cid/cis1043
9. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST files/Consulation/EUCAST guidelines detection of resistence mechanism 121222.pdf
10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. Version 3.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement M 100-S24. Wayne. PA. USA: CLSI; 2014
12. Scientific opinion on the public health risk of bacterial strains producing extended-spectrum β-lactamases and/or AmpC β-lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 2011; 9(8):2322. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2322.pdf
13. WHO. *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. Geneva: World Health Organization; 2014.
14. Diwan V. Tamhankar AJ. Khandal RK *et al*. "Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain. India". BM. *Public Health* 2010; 10: 414
15. Clermont, O., Christenson, Julia K., Denamur, E. and Gordon, D.M. (2013) "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-goups". Envir Micr Report 5 (1) 2013, 58-65
16. Woodford, N., Fagan, E.J. and Ellington, M.J. (2006) "Multiplex PCR for rapid detection og genes encoding CTX-M extended-spectrum β-lactamase". Antimic Chemot 2006 Jan; 57 (1):15 4-5
17. Arlet, G., Rouveau, M. and Philippon, A. "Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β-lactamase". Microbiol Lett. 1997, 1, 152(19):16 3-7
18. Mabilat, C., *et al* (1990) "Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended-broad-spectrum β-lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumonia"*. Plasmid 1990; 23:27-34
19. Dierikx, C., *et al* (2010) "Increased detection of extended-spectrum β-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry". Vet Microbiol 2010; 145:273-278
20. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *et al*. "Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study". The Lancet Infect Dis 2016; 16:161-168
21. Carmen Dahms, Nils-Olaf Hübner, Annelene Kossow, Alexander Mellmann, Kathleen Dittmann, Axel Kramer. "Occurrence of ESBL-Producing Escherichia coli in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany". PLOS ONE I DOI:10.1371/journal.pone.0143326 November 25, 2015
22. Dariusz Wasyl, Magdalena Zając, Anna Lalak, Magdalena Skarżyńska,Ilona Samcik, Renata Kwit, Artur Jabłoński, Łukasz Bocian, Grzegorz Woźniakowski, Andrzej Hoszowski, and Krzysztof Szulowski. "Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland". Microbial Drug resistance, Vol. 24, N°6, 2018. https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0148
23. Patrícia Poeta, Hajer Radhouani, Luís Pinto, António Martinho, Vítor Rego, Rogério Rodrigues, Alexandre Gonçalves, Jorge Rodrigues, Vanesa Estepa, Carmen Torres and Gilberto Igrejas. "Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups". Journal of Basic Microbiology 2009, *49*, 584–588
24. Wietske Dohmen, Alejandro Dorado-GarcõÂa, Marc J. M. Bonten, Jaap A. Wagenaar, Dik Mevius, Dick J. J. Heederik. "Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials". PLOS ONE | https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094 March 21, 2017 14
25. Alexandre Goncalves, Carmen Torres, Nuno Silva, Catarina Carneiro, Hajer Radhouani, Ce´line Coelho, Carlos Arau´jo, Jorge Rodrigues, Laura Vinue´, Sergio Somalo, Patrı´cia Poeta and Gilberto Igrejas. "Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Escherichia coli Isolates of Pigs from a Portuguese Intensive Swine Farm". Foodborne Pathogens And Disease Volume 7, Number 12, 2010
26. N. Geser, R. Stephan, P. Kuhnert, R. Zbinden, U. Kaeppeli, N. Cernela And H. Haechler. "Fecal Carriage of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland". Journal of Food Protection, Vol. 74, No. 3, 2011, Pages 446-449

PARAMETRI DI IMMUNITÀ PROTETTIVA NEL SUINO INDOTTI DA VACCINI PCV2 A DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE

PARAMETERS OF PROTECTIVE IMMUNITY IN SWINE INDUCED BY PCV2 VACCINES WITH DIFFERENT ANTIGEN PAYLOAD

GUARNERI F.[1], AMADORI M.[1], BONIOTTI M.B.[2], BARBIERI I.[3] , LELLI D.[4] , TRESOLDI E.T.[5]

[1]Laboratorio Benessere Animale, Biochimica Clinica e Immunologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; [2]Laboratorio di Genomica, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; [3]Laboratorio Analisi Genomiche, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; [4]Laboratorio di Virologia, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, via A. Bianchi 9, 25124 Brescia, Italia; [5]DMV, Specialista in Scienza e Medicina degli Animali da Laboratorio; Specialista in Sanità Animale, Allevamento e Produzioni Zootecniche

Parole chiave: suino, vaccino, PCV2.
Key words: swine, vaccine, PCV2.

RIASSUNTO: Il Circovirus suino tipo 2 (PCV2) è un patogeno ubiquitario nella popolazione suina ed è considerato l'agente eziologico principale del complesso di malattie Circovirus suino-associate (PCVAD), che comprende la sindrome da deperimento multisistemica post svezzamento (PMWS), malattie respiratorie, il complesso dermatite / nefropatia e problemi riproduttivi. PCVAD corrisponde a sindromi multifattoriali, innescate da co-infezioni con altri patogeni comuni (ad esempio, arterivirus PRRS, Parvovirus suino) e/o da stressori ambientali non-infettivi (ad esempio densità, dieta, variazioni di temperatura e umidità relativa). Dal momento che PCVAD colpisce gravemente l'industria suinicola in tutto il mondo, diversi vaccini sono stati sviluppati per ridurre le infezioni da PCV2 e la sua progressione a PCVAD. Tali vaccini, ancorché efficaci, sono scarsamente standardizzati in termini di dosaggio dell'antigene e di parametri riconosciuti di protezione dei suini vaccinati. Abbiamo pertanto selezionato 20 suini (ibrido Goland) di 40 giorni di vita, allocati a 4 gruppi da cinque l'uno con residui uniformi di anticorpi materni anti-PCV2. I gruppi sono stati vaccinati, rispettivamente, con 450/150/50/0 ng di un ceppo PCV2b inattivato con beta-propiono-lattone, formulato nel medesimo adiuvante del vaccino commerciale Circovac. A 27 giorni dalla vaccinazione, tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2 omologo. I risultati principali possono essere riassunti come segue: 1) Nessun sintomo clinico è stato osservato nei suini oggetto di studio. 2) E' stata osservata viremia in tutti i suini di controllo (gruppo PBS + adiuvante), come pure in due suini dei gruppi 150 e 50 nanogrammi. Nessun suino del gruppo 450 ng ha sviluppato viremia. 3) Non c'è stata alcuna correlazione sui singoli animali tra titolo di Ab ELISA e protezione, anche se il gruppo 450 nanogrammi ha sviluppato in media un titolo anticorpale più elevato. 4) In accordo con il nostro studio del 2015, tutti i suini con risposta IFN-gamma PCV2-specifica a 3 settimane dalla vaccinazione erano totalmente protetti nei confronti dell'infezione sperimentale. Inoltre, tale risposta è stata indotta solo dalla vaccinazione, non

dall'infezione sperimentale. Sulla base di tali dati, il saggio IFN-gamma può costituire un valido strumento per la verifica della vaccinazione PCV2 e della sua efficacia. Inoltre, la definizione in vitro di parametri chiari ed affidabili di protezione può contribuire ad una futura riduzione delle infezioni sperimentali dei suini per valutare l'efficacia dei diversi lotti di vaccino PCV2.

ABSTRACT: Porcine Circovirus 2 (PCV2) is a ubiquitous pathogen in the swine population and is considered the main etiologic agent of the Porcine circovirus associated disease (PCVAD) complex, which includes post-weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS), respiratory diseases, dermatitis/nephropathy and reproductive problems. PCVAD corresponds to multifactorial syndromes, caused by co-infections with other common pathogens (e.g. PRRS Arterivirus, porcine Parvovirus), and/or by environmental stressors (e.g. density, diet, variations in temperature and relative humidity). Since the disease severely affects the swine industry worldwide, different vaccines have been developed to reduce PCV2 infections and its progression to PCVAD. Such vaccines, albeit effective, are poorly standardized in terms of antigen payload and recognized correlates of protection. Therefore, we selected twenty, 40-day old piglets (Goland hybrid), and allocated them to 4 groups (5 animals each) with uniform levels of maternally-derived antibody to PCV2. Animals were vaccinated with 450/150/50/ 0 ng of an inactivated PCV2b strain, formulated in the same adjuvant of the commercial Circovac vaccine. Twenty-seven days later, all pigs were challenged intranasally with 200,000 TCID50% of the homologous PCV2 strain. The main findings can be summarized as follows: 1) No clinical signs were observed in the pigs under study. 2) Viremia was observed in all the control pigs, as well as in 2 pigs of the 150 and 50 ng groups, respectively. No pigs of the 450 ng group developed viremia. 3) There was no correlation whatsoever between protection and ELISA Ab titers in the single animals, even though the 450 ng group developed on average a stronger Ab response. 4) In agreement with our previous study of 2015, all the pigs with a PCV2-specific IFN-gamma response at 3 weeks after vaccination were fully protected against viremia. Owing to the above, the IFN-gamma assay can represent a useful tool for monitoring PCV2 vaccination and its efficacy. Also, in vitro clear and reliable immune parameters can contribute to a future reduction of swine in challenge experiments to evaluate the efficacy of PCV2 vaccines.

INTRODUZIONE

Ricerche approfondite hanno suddiviso i ceppi PCV2 in due gruppi principali designati come genotipo "a" (PCV2a) e "b" (PCV2b). Più tardi, un terzo genotipo (PCV2c) è stato retrospettivamente descritto in suini danesi nel 1980. Infine, un quarto genotipo (PCV2d) è stato descritto per la prima volta in Cina e, successivamente, in tutto il mondo; esso è attualmente considerato un genotipo emergente. Un cambiamento è stato descritto del genotipo predominante da PCV2a a PCV2b, forse associato al decorso epidemico dei casi di malattia sostenuti da PCV2. I vaccini PCV2 attuali sono basati sul genotipo "a" e sarebbero in grado di produrre un'estesa immunità crociata. Tuttavia, sebbene non sussistano prove conclusive di meccanismi di evasione della risposta immunitaria, vi sono ipotesi in tal senso basate per l'appunto sulla variabilità genomica sopra riportata. L'efficacia dei vaccini PCV2 è stata correlata con ridotti livelli di viremia, associata alla comparsa di anticorpi neutralizzanti anti-PCV2 e di cellule interferone-gamma-secernenti (IFN-γ-SC), come evidenziato da numerose pubblicazioni. Vi sono tuttavia dati contrastanti circa il ruolo della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata ai vaccini PCV2, così come le ripercussioni positive dei vaccini PCV2 su altre malattie virali e batteriche nella specie suina (Kixmoller et al., 2008). I vaccini PCV2 sono prodotti e formulati sulla base di parametri diversi, poco chiari, che rendono

molto complessa la loro valutazione di efficacia rispetto alla dose di antigene effettivamente impiegata. E' necessario pertanto introdurre elementi di standardizzazione e di valutazione omogenea dei vaccini in uso per un loro impiego più razionale. E' necessario altresì definire affidabili parametri di risposta immunitaria protettiva sui quali tarare l'efficacia dei vaccini di vecchia e nuova generazione. Gli obiettivi di questo progetto sono stati pertanto: determinare la correlazione tra dose Ag PCV2 e risposta del sistema immunitario e correlare la protezione (assenza di viremia dopo infezione sperimentale) con una dose minima di Ag PCV2.

MATERIALI E METODI

Produzione dell'antigene PCV2

Sulla base di prove preliminari di efficacia, per l'amplificazione della massa antigenica di PCV2 sono state scelte cellule di rene suino PK-15c28, persistentemente infette dal ceppo PCV2b "DV6503", isolato in provincia di Mantova nel 1999. Dopo 4-5 giorni di coltura, tali cellule venivano sottoposte a doppio ciclo di congelamento/scongelamento a -80° e a centrifugazione (8000 *g*, 16 minuti, 4°C) per rimuovere i detriti cellulari. Ciascun lotto di produzione veniva poi congelato nuovamente a -80°C in attesa dei controlli d'infettività (titolazione in immuno-fluorescenza su cellule PK-15c28 non infette) e di saggio ELISA con anticorpi monoclonali anti-PCV2.

Sulla base di tali saggi, sono stati prescelti i lotti di PCV2 a più alto contenuto di Ag. Questi sono stati scongelati e inattivati a 4°C con beta-propiono-lattone (BPL) 0,05% finale, inoculato 2 volte, rispettivamente al giorno 0 e al giorno 7 del trattamento. Al giorno 14, il virus è stato sottoposto a controllo di inattivazione su cellule PK-15c28 non infette mediante immunofluorescenza e Real-time PCR sul surnatante delle cellule PK-15 inoculate. Dopo l'esito favorevole del controllo d'inattivazione, il virus è stato concentrato 10X mediante ultrafiltrazione su membrana a taglio molecolare 10 kDa. Il virus inattivato concentrato è stato nuovamente congelato in aliquote a –80°C.

Formulazione del vaccino PCV2 a diverse dosi

Il virus inattivato, ottenuto come sopra descritto, è stato prima chiarificato ancora (8000 g, 16 minuti, 4°C) e poi pellettato mediante ultracentrifugazione su rotore T42.1 a 35.000 rpm per 3,5 ore a 4°C. E' stato allontanato il sovrastante ed il pellet virale è stato risospeso per una notte in frigorifero in 1 ml per tubo di tampone PBS (= concentrazione 25X). Il virus così ottenuto è stato poi aliquotato e conservato a -80°C in attesa dei controlli di processo.

Ciascuna aliquota di virus inattivato è stata sottoposta ad analisi su gradiente lineare di saccarosio 10-25% su rotore SW40 come descritto in precedenza (Zanotti, Amadori, 2015). Secondo tale procedura, dall'area dei picchi UV a 254 nm di PCV2 (coefficiente di sedimentazione 57S) è stata calcolata la concentrazione in nanogrammi/mL. A differenza di quanto ottenuto nel nostro studio precedente (Zanotti, Amadori, 2015), abbiamo valutato la presenza di due distinte popolazioni virali, caratterizzate da lieve differenza di sedimentazione in gradiente di saccarosio, denominate "picco precoce" e "picco tardivo". Per dirimere i possibili dubbi, abbiamo prelevato aliquote di entrambi i picchi, che abbiamo inviato al laboratorio di microscopia elettronica di IZSLER. Le analisi eseguite hanno confermato la presenza di Circovirus in entrambi i picchi. L'identità PCV2 di tali componenti è stata controllata mediante Real-time PCR. Tuttavia, il saggio ELISA sandwich con anticorpi monoclonali murini ha rivelato una fondamentale differenza, poiché una piena reattività è stata evidenziata solo sul "picco tardivo", mentre una reazione nulla o dubbia veniva evidenziata sul "picco precoce". A questo punto, per porsi nelle stesse condizioni realizzate nel progetto IZSLER precedente (Zanotti, Amadori, 2015), è stato deciso di

formulare il vaccino sperimentale sulla base del contenuto antigene del solo "picco tardivo", rispettivamente a 450, 150, 50, 0 ng/dose (Tabella 1).

Tabella 1. Dosi di antigene PCV2 inoculate nei diversi gruppi di suini
Table 1. PCV2 antigen doses in the different swine groups

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D
Dosi Ag Picco PCV2 "tardivo"	450 ng	150 ng	50 ng	0 ng

Tali dosi di Ag PCV2 sono state ottenute per diluizione in PBS e si riferiscono a 2160 microlitri di volume. A tale volume venne poi aggiunto un volume di 2840 microlitri di adiuvante oleoso del vaccino PCV2 Circovac (CEVA Italia) per ottenere il volume di inoculo di 0,5 mL. Nel gruppo di controllo, l'antigene PCV2 era sostituito da tampone PBS.

Produzione e controllo di PCV2 per infezione sperimentale
Lo stesso ceppo DV6503 di PCV2b è stato nuovamente amplificato mediante propagazione delle cellule persistentemente infette cellule PK-15 sopra descritta.
Il PCV2 infettante per l'infezione sperimentale dei suini vaccinati è stato quantificato sulla base di una diluizione limite accertata in Real-time PCR (ultima diluizione del virus corrispondente ad un abbassamento significativo del "ciclo soglia"). Sulla base di tale risultato, il titolo infettante è stato calcolato mediante saggio di Reed & Muench (dati non mostrati).

Sperimentazione animale
E' stata ottenuta l'autorizzazione ministeriale alla sperimentazione animale n. 230/2018 del 14/3/2018 ai sensi dell'art. 31 del D.lgs 26/2014.
Venti suinetti di ibrido commerciale "Goland" sono stati trasportati alle stalle autorizzate di IZSLER a 28 giorni di vita dopo lo svezzamento. Gli animali provenivano da 3 distinte nidiate, come risultava da apposita marca auricolare. Gli animali sono stati sottoposti a visita clinica e stabulati in 4 diverse stalle d'isolamento con idonei arricchimenti ambientali (paglia e catenelle pensili). Gli animali sono stati fatti acclimatare al nuovo ambiente e dopo 2 giorni è stato eseguito un prelievo di sangue per valutare la persistenza degli anticorpi materni anti-PCV2 mediante saggio ELISA. Sulla base dei titoli anticorpali, gli animali sono stati suddivisi in 4 gruppi: A, B, C, D equilibrando opportunamente il titolo medio di anticorpi materni e garantendo la presenza di suini delle tre nidiate in ciascun gruppo.
Dopo ulteriore acclimatamento e stabilizzazione, i gruppi sono stati inoculati con i vaccini PCV2 sopra descritti (dose di 0,5 mL per via intramuscolare profonda nella regione del collo) (Tabella 1).
Dopo 21 giorni, è stato prelevato nuovamente il sangue per valutare il profilo della risposta anticorpale e dell'immunità cellulo-mediata (rilascio di interferon-gamma e di interleuchina-10 dopo stimolazione con PCV2 inattivato).
Dopo altri 5 giorni tutti i suini sono stati infettati per via intranasale con 2 ml di PCV2 ceppo DV6503, corrispondenti a 200.000 dosi infettanti mediane 50% calcolate come sopra descritto.
Sono stati effettuati prelievi di sangue al giorno 21 post vaccinazione (PV) e ai giorni 7, 14, 21, 35 post infezione (PI) sperimentale.

Saggio di rilascio di IFN-γ e interleuchina (IL)-10 PCV2 specifico
Il sangue eparinato è stato distribuito in 3 repliche da 0.5 ml in piastra Costar a 48 pz e incubato, rispettivamente, con: 50 µL di terreno RPMI 1640, PCV2 inattivato BPL e

criolisato PK-15 inattivato BPL. La piastra è stata incubata 16-20 ore a 37°C in 5% CO_2. Successivamente, il plasma è stato raccolto ed è stato trasferito in piastrina ELISA per la determinazione di IFN-gamma suino come precedentemente descritto (Dotti et al. 2013). Dopo misurazione della densità ottica (DO), il campione viene considerato: **positivo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 è superiore o uguale a 0.05 OD; **negativo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 risulta essere inferiore o uguale a 0.019 OD; infine il campione viene considerato **debolmente positivo** se la differenza tra le medie delle OD del plasma con PCV2 e la media delle OD del plasma con criolisato di cellule PK-15 risulta essere compreso tra 0.020 e 0.049 OD. La medesima procedura di analisi e valutazione è stata adottata per il saggio di rilascio di interleuchina 10 (IL-10).

Risposta anticorpale
Gli anticorpi dei suini anti-PCV2 sono stati determinati mediante Elisa Competitiva (IZSLER, MP 04/110 rev 0 – 2012).

PCV2 DNA in siero
La quantificazione del DNA di PCV2 è stata effettuata su campioni di siero tramite Real-Time PCR quantitativa (IZSLER, MP 09/106 rev 0 – 2011). I risultati sono stati espressi come copie genomiche PCV2/ml di siero.

Analisi statistica
Le differenze di titolo anticorpale e di pesi tra gruppi e all'interno dei gruppi sono state analizzate mediante analisi della varianza per misure ripetute. Le prevalenze di reattori IFN-gamma+ e IL-10+ all'interno dei gruppi sono state analizzate con il test esatto di Fisher. La correlazione nei singoli suini tra risposta IFN-gamma e risposta IL-10 è stata analizzata mediante il test di Pearson. Il livello di significatività è stato collocato a $P < 0,05$. Sono state altresì riconosciute tendenze a $P < 0,1$ (GraphPad Prism, Version 3).

RISULTATI

Valutazione clinica
L'infezione sperimentale non ha causato alcun sintomo clinico negli animali. Si sono tuttavia osservate notevoli differenze di accrescimento ponderale tra i diversi suini all'interno di ciascun gruppo, ma non tra gruppi distinti per dose di Ag PCV2 (ANOVA, $P > 0,05$).

Viremia PCV2
Tutti gli animali sono risultati negativi in termini di presenza di copie genomiche di PCV2 il giorno dell'infezione sperimentale. L'analisi in PCR real-time quantitativa ha confermato la presenza di DNA di PCV2 ai giorni 14, 21, 35 post infezione sperimentale, inizialmente nei gruppi di controllo (gruppo D). Al contrario, i soggetti vaccinati sono risultati protetti dall'infezione da PCV2, tranne due animali dei gruppi 50 e 150 ng/dose, i quali hanno mostrato viremia transitoria (Tabella 2). Nessun animale del gruppo a 450 ng/dose ha sviluppato viremia.

Risposta anticorpale
Nel giorno della vaccinazione erano ancora presenti livelli modesti di anticorpi materni, bilanciati nei diversi gruppi. La presenza di tali anticorpi non ha interferito con l'infezione da PCV2 negli animali di controllo in termini di viremia post-infezione sperimentale.

I suini hanno manifestato siero-conversione dopo vaccinazione, significativamente superiore nel gruppo 450 ng rispetto agli altri gruppi (ANOVA, P< 0,05). Tuttavia, sui singoli animali il titolo anticorpale non si è rivelato predittivo di protezione verso la viremia (picchi viremici associati a picchi del titolo anticorpale). Dopo l'infezione sperimentale, gli anticorpi ELISA hanno avuto un periodo di sviluppo diverso. Fino al giorno 14 PI, i suini vaccinati hanno mantenuto livelli anticorpali superiori (vedi Figura 1, ma P > 0,05). Dal giorno 14 dopo infezione sperimentale in poi, i livelli di Ab ELISA si sono uniformati nei gruppi e sono rimasti elevati fino al giorno 35 PI con differenti fluttuazioni (Figura 1). Già a 21 giorni post infezione non si sono osservate differenze di sieroconversione tra suini vaccinati e di controllo (P > 0,05).

Risposta IFN-γ

Rilascio di IFN-γ specifico per PCV2 è stato analizzato in tutti gli animali (Tabella 2). Tutti i suini hanno mostrato un risultato negativo all'inizio dell'esperimento, prima della vaccinazione. Al giorno 21 post vaccinazione, quindi prima dell'infezione sperimentale, la risposta dei soggetti vaccinati era chiaramente diversa da quella dei controlli ed è stata una risposta predittiva di protezione contro la viremia. Inoltre, tutti i soggetti viremici erano IFN-gamma negativi e con titolo anticorpale ≤ 1:100 a tre settimane dalla vaccinazione, a testimonianza di una stimolazione non efficace del sistema immunitario. In particolare, si è notato che alcuni suini dei gruppi vaccinati A/B/C sono risultati positivi al rilascio di IFN-γ a tre settimane dalla vaccinazione, ma non a 7 giorni dalla infezione sperimentale, data in cui tutti gli animali sono invece risultati negativi all'analisi (tendenza, P < 0,1). I suini del gruppo D (gruppo di controllo) sono rimasti negativi in tutti i punti temporali analizzati, prima e dopo infezione sperimentale. In tutti i gruppi vaccinati la frequenza di risposta nel periodo 21 giorni PCV – 35 giorni PI è risultata significativamente superiore a quella dei controlli (P < 0,01).

Risposta IL-10

Risposte IL-10 a vaccinazione e infezione sono state osservate in tutti i gruppi ai diversi tempi. Il gruppo 50 ng ha manifestato una prevalenza di risposta significativamente più elevata rispetto al gruppo controllo (P < 0,05) a differenza degli altri gruppi vaccinati. Una differenza numerica (P = 0,11) è stata osservata nella frequenza di reattori viremici IL-10+, rispetto ai suini viremici IL-10 negativi. Infine, considerando i valori numerici assoluti della risposta svincolati dalle soglie di positività, abbiamo osservato una significativa correlazione positiva (P < 0,01) tra risposta IFN-gamma e risposta IL-10 nei suini controllo, ma non nei suini vaccinati. In tali animali l'indice di correlazione è risultato anzi negativo ai dosaggi 150 e 450 ng.

DISCUSSIONE

Le analisi condotte hanno evidenziato come l'infezione sperimentale non abbia causato alcun sintomo clinico negli animali, a conferma dell'assoluta necessità di un potente stressore infettante o non infettante associato a PCV2 per indurre malattia. Inoltre, abbiamo potuto notare differenze notevoli nello stesso gruppo in un parametro produttivo quale il peso (± 20 kg alla macellazione all'interno dei gruppi), per cui a parità di condizioni alimentari si è notata una discrepanza significativa nella crescita. Perciò la protezione virologica (blocco della viremia) indotta dal vaccino non ha sempre corrisposto a parametri produttivi omogenei (incremento ponderale).

Un altro aspetto dedotto dall'analisi dei risultati è che i suini non hanno manifestato siero-

conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano pertanto presenti solo livelli medio-bassi residui di anticorpi materni. Inoltre i suini hanno risposto al vaccino e alla successiva infezione sperimentale con la produzione di anticorpi ELISA proporzionale al dosaggio antigene. Ci riserviamo di ricontrollare nel prossimo futuro i sieri con un saggio di neutralizzazione di PCV2, per poter meglio integrare le osservazioni di cui sopra.

Un ulteriore aspetto riguarda il saggio di rilascio di IFN-γ. Questo saggio su sangue intero si è confermato come procedura affidabile e pratica per valutare l'efficacia dei vaccini PCV2, in accordo con i nostri risultati precedenti (Zanotti et al., 2015). Infatti, a conferma di ciò, la risposta cellulo-mediata a PCV2 è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione della risposta IFN-gamma PCV2-specifica.

Uno degli obiettivi di questo lavoro è stato determinare la correlazione tra dose Ag PCV2 e risposta del sistema immunitario. Questo potrebbe essere in effetti un fattore cruciale alla base dell'induzione di immunità protettiva indotta dai vaccini PCV2. Al fine di determinare la massa di antigene PCV2, è stato adottato un sistema di purificazione e quantificazione ed il relativo modello di vaccinazione / infezione sperimentale da PCV2 (Zanotti, Amadori, 2015), per confrontare l'effetto immunizzante di tre differenti dosi di antigene di PCV2 inattivato nello stesso adiuvante. Nelle nostre condizioni sperimentali, le tre dosi (450-150-50 ng/dose) dell'antigene inattivato PCV2 e l'adiuvante commerciale Circovac sono state in grado di indurre a diverso livello una risposta immunitaria protettiva nei suini.

I risultati fin qui ottenuti potrebbero essere utili per i produttori di vaccini in vista di una migliore standardizzazione dei controlli della produzione dei vaccini PCV2 e della loro efficacia. Tale standardizzazione sarebbe inoltre funzionale all'adozione di una politica di riconoscimento dei lotti di produzione del vaccino sulla base della corrispondenza a criteri definiti, nell'ambito del sistema di qualità del processo produttivo.

L'affinamento dei parametri di valutazione ed utilizzo dei vaccini PCV2 ha una notevole importanza per la sicurezza alimentare nella produzione primaria, in quanto la corretta immunizzazione dei suini verso PCV2 produce risultati globalmente positivi per le aziende suinicole. Tale vaccino è alla base di una riduzione dei casi di malattia sostenuti anche da altri agenti microbici (Kixmoller et al., 2008) e del corrispondente fabbisogno di antibiotici in allevamento. Inoltre, la riduzione dei casi di malattia di cui sopra contribuisce globalmente alla condizione di benessere negli allevamenti suinicoli.

CONCLUSIONI

1. In accordo con i nostri dati precedenti, l'infezione sperimentale non ha causato alcun sintomo clinico negli animali, a conferma dell'assoluta necessità di un potente stressore infettante o non infettante associato a PCV2 per indurre malattia.
2. I suini non hanno manifestato siero-conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano pertanto presenti solo livelli medio-bassi residui di anticorpi materni.
3. In accordo con i nostri risultati precedenti (Zanotti et al., 2015), la risposta cellulo-mediata a PCV2 è stata osservata dopo vaccinazione, ma non dopo infezione sperimentale, che ha comportato al contrario una transitoria riduzione

della risposta IFN-gamma PCV2-specifica. Tale risposta costituisce pertanto un parametro importante di controllo dell'efficacia dei vaccini PCV2.

4. I suini hanno risposto al vaccino e alla successiva infezione sperimentale con la produzione di anticorpi ELISA proporzionale al dosaggio antigene, a differenza di quanto osservato nel nostro studio precedente (Zanotti et al., 2015) in cui era stato impiegato un ceppo PCV2a a differente dosaggio.
5. I risultati fino ad ora ottenuti potrebbero essere utili per i produttori di vaccini in vista di una migliore standardizzazione dei controlli della produzione dei vaccini PCV2 e della loro efficacia. In tal senso, 500 ng/ dose circa di antigene PCV2 (virione inattivato) sarebbero da considerarsi dose minima efficace per una soddisfacente immunizzazione dei suini.

RICONOSCIMENTI

Lo studio è stato finanziato dal Ministero della Salute nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente IZSLER codice PRC2016013. Gli autori desiderano ringraziare la Signora Cinzia Mantovani (IZSLER, Laboratorio Benessere Animale, Biochimica Clinica e Immunologia Veterinaria) per la preziosa collaborazione tecnica fornita allo studio.

BIBLIOGRAFIA

1. Dotti S, Guadagnini G, Salvini F, et al. Time-course of antibody and cell-mediated immune responses to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus under field conditions. Res Vet Sci 2013;94:510–517.
2. Kixmoller M, Ritzmann M, Eddicks M, et al. Reduction of PMWS-associated clinical signs and co-infections by vaccination against PCV2. Vaccine 2008;26:3443-3451.
3. Meerts P, Misinzo G, Lefebvre D, et al. Correlation between the presence of neutralizing antibodies against porcine circovirus 2 (PCV2) and protection against replication of the virus and development of PCV2-associated disease. BMC Vet Res 2006;2:6.
4. Trible, B. R., M. Kerrigan, N. Crossland, M. Potter, K. Faaberg, R. Hesse and R. R. R. Rowland, 2011: Antibody recognition of Porcine circovirus type 2 capsid protein epitopes after vaccination, infection, and disease. Clinical and Vaccine Immunology, 18, 749-757.
5. Zanotti C, Martinelli N, Lelli D, Amadori M. 2015. Correlates of Protection Following Vaccination with Inactivated Porcine Circovirus 2 Vaccines. Viral Immunol. 2015 Dec;28(10):600-8.
6. Zanotti C, Amadori M., 2015. A simple method for measuring porcine circovirus 2 whole virion particles and standardizing vaccine formulation. Biologicals. 2015 Mar;43(2):79-83.

Tabella 2. Saggio di rilascio di IFN-γ . I gruppi A, B, C hanno manifestato positività nel saggio IFN-γ a tre settimane dalla vaccinazione, ma non 7 giorni dopo infezione sperimentale, data in cui tutti gli animali sono risultati negativi all'analisi. I suini del gruppo D (gruppo di controllo) sono rimasti negativi in tutti i punti temporali, prima e dopo infezione sperimentale. I risultati sono espressi come mOD di differenza rispetto al controllo negativo (stimolazione con criolisato di cellule PK-15). p.i. : post infezione. * viremia PCV2 presente.

	Suino	T0	T 21 Post Vaccinazione	T 7 p.i.	T 14 p.i.	T 21 p.i.	T 35 p.i.
450 ng PCV2, GRUPPO A	5	NEG	NEG	NEG	56	77	NEG
	17	NEG	112	NEG	36	NEG	NEG
	18	NEG	57	NEG	64	NEG	NEG
	14	NEG	NEG	NEG	NEG	35	NEG
	15	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
150 ng PCV2, GRUPPO B	10	NEG	NEG	NEG	25	NEG	NEG
	12	NEG	20	NEG	29	NEG	NEG
	13	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	19	NEG	NEG	NEG	NEG*	29	NEG
	20	NEG	50	NEG	98	54	NEG
50 ng PCV2, GRUPPO C	11	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG*
	7	NEG	141	NEG	NEG	115	NEG
	8	NEG	NEG	NEG	44	31	NEG
	9	NEG	52	NEG	30	39	148
	16	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*
CONTROLLO, GRUPPO D	6	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*
	2	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG
	3	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG*
	4	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG
	1	NEG	NEG	NEG	NEG*	NEG*	NEG

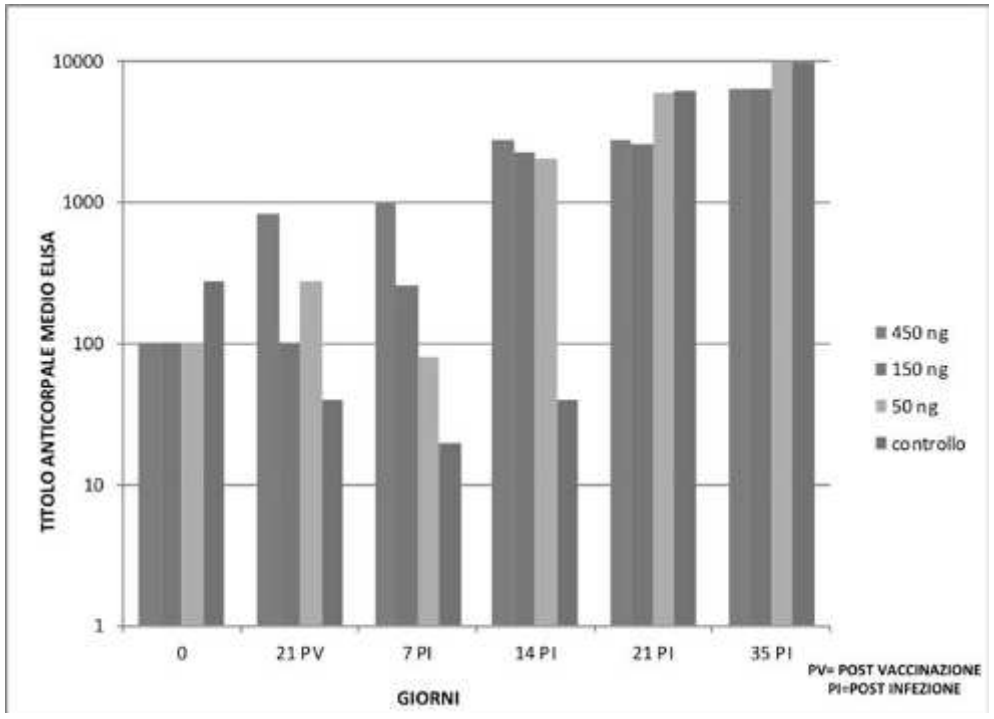


Figura 1. Titolo anticorpale anti-PCV2 misurato in ELISA. I suini non hanno manifestato siero-conversione prima della vaccinazione, al momento della quale erano quindi presenti solo livelli medio-bassi di anticorpi materni residui (T0). I suini hanno risposto al vaccino (21 PV) e alla successiva infezione sperimentale (7, 14, 21, 35 PI) con la produzione di titoli anticorpali ELISA, superiori nei suini vaccinati (differenza numerica) nelle prime due settimane post infezione.

RISULTATI PRELIMINARI DI CONFRONTO TRA DIFFERENTI PROTOCOLLI DIAGNOSTICI PER IL MONITORAGGIO DELLA PRRSV NEI SUINETTI SOTTOSCROFA

PRELIMINARY RESULTS OF COMPARISON BETWEEN DIFFERENT DIAGNOSTIC PROTOCOLS FOR PRRSV MONITORING IN SUCKLING PIGLETS

TONNI M.[1], MAISANO A.M.[1], BONIOTTI M.B.[1], OSTANELLO F.[2], LEOTTI G.[3], SCALI F.[1], SANTUCCI G.[1],ANDREONI S.[3], ALBORALI G.L.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia;
[2] Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie – Università di Bologna;
[3] Boehringer Ingelheim Italia AH – Milano.

Parole Chiave: PRRSV, monitoraggio, emosieri testicolari
***Key Words*:** PRRSV, monitoring, processing fluids

RIASSUNTO
Questo studio si è posto come obiettivo la valutazione di un metodo alternativo alla analisi biomolecolare del siero ematico come materiale diagnostico routinario per il controllo della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS). Il nuovo materiale utilizzato corrisponde al liquido biologico percolato da pool di testicoli asportati al momento della castrazione, chiamato emosiero testicolare (ET). Dai suinetti sottoscrofa sono stati raccolti campioni di sangue (414) e pool di ET (71) in 4 allevamenti suinicoli del Nord Italia, successivamente analizzati con RT-PCR real time. I risultati ottenuti dal confronto hanno evidenziato un indice di Concordanza del 97,2% e un valore della k di Cohen dello 0,92 (IC95%: 0,81-1,00) in linea con quanto riportato in letteratura. Considerando i campioni raccolti su sangue come materiale di riferimento sono stati calcolati i valori di sensibilità pari all'88,2% (IC95%: 63,6-98,5%) e specificità del 100% (IC95%: 93,4-100%). L'utilizzo degli ET è da considerarsi una valida alternativa all'impiego del siero ematico nei protocolli di monitoraggio della PRRS, dato l'elevato grado di concordanza con la metodica di riferimento. Inoltre, l'uso di ET è preferibile poiché prevede il campionamento di materiale biologico di "scarto", facile da campionare, con un minimo spreco di materiali consumabili, tempo e risorse. Questa soluzione è inoltre vantaggiosa poiché non sottopone i suinetti ad ulteriori procedure stressanti comportando difatti un minor impatto sul benessere animale.

ABSTRACT
Swine porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a widespread disease, which requires proper monitoring tools. Aim of this study was the evaluation of an alternative method to blood serum samples for the routine biomolecular analysis of PRRS. The proposed material, known as processing fluids (PF), is a biological liquid leached from testicles taken during castration. Blood samples (n=414) and PF (n=71) were collected from suckling piglets in four farrow-to-weaning farms in North of Italy and, subsequently, analysed by RT PCR real time. Results showed a Concordance Index of 97.2% and Cohen's kappa statistic of 0.92 (CI95%: 0.81-1.00). Considering blood samples as reference material, sensibility and specificity of PF sampling were 88.2% (CI95%: 63.6-98.5%) and 100% (CI95%: 93.4-100%) respectively. The results of this

study, as well as data available in literature, suggest that PF samples should be considered a viable alternative of blood serum samples in PRRS monitoring protocols. Furthermore, PF provide several advantages such as: recycle of "waste" biological material, low supply consumption, easy and fast sampling. Finally, PF represent a convenient solution for animal welfare too because sampling PF could avoid stressful procedures for piglets.

INTRODUZIONE

L'agente eziologico della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è un virus RNA a catena positiva della famiglia Arteriviridae (PRRSV) ed è presente nella maggior parte degli allevamenti di suini italiani. La frequenza dei casi di malattia è variabile ma ad oggi rimane una delle principali cause di perdite economiche. La manifestazione clinica della PRRS è strettamente collegata all'età dei suini, le scrofe soffrono di problemi riproduttivi che possono evidenziarsi mediante aborti epidemici, mummificazioni fetali e natimortalità, nei verri si osserva invece una diminuzione della fertilità. I sintomi della sindrome respiratoria nei suini svezzati e nei magroni sono: febbre, tosse, dispnea, congiuntivite, anoressia, rallentamento della crescita, letargia a cui si possono associare infezioni batteriche secondarie che contribuiscono all'aumento della mortalità (Jeffrey et al., 2012). Un aspetto critico per il controllo della malattia è l'interruzione del ciclo di trasmissione in scrofaia con la produzione di suini svezzati PRRSV-free (Corzo et al., 2010), questo obiettivo viene raggiunto con un monitoraggio routinario continuo e l'applicazione di protocolli immunologici. Attualmente il Gold standard per il monitoraggio consiste nel controllo mensile mediante PCR su siero ematico di suinetti prima dello svezzamento (Holtkamp et al., 2011). Un tipico protocollo prevede di testare 30 soggetti suddivisi tra inizio, metà e fine lattazione e per ogni fase vengono scelte 5 nidiate di primipare e 5 di pluripare da cui prelevare un singolo suinetto. Con questa procedura i risultati sono attendibili, tuttavia può comunque capitare di registrare una prevalenza prossima allo zero in allevamenti endemicamente infetti (Linhares, 2013). Ai fini di un monitoraggio continuo per PRRSV sono stati descritti in letteratura molti protocolli diagnostici che prevedono la raccolta di vario materiale biologico. La raccolta di fluidi orali è un altro metodo che consente di avere un campione più rappresentativo dell'allevamento ma non è funzionale per i suinetti sottoscrofa. Un nuovo metodo che sta iniziando ad essere applicato e che richiede degli approfondimenti è l'utilizzo dei cosiddetti emosieri testicolari (ET), ovvero il liquido biologico recuperato da un pool di testicoli asportati al momento della castrazione. Per la prima volta nel 2018 la relazione annuale dello Swine Disease Reporting System che illustra i dati sul monitoraggio della maggior parte degli allevamenti suinicoli statunitensi ha riportato un consistente incremento dell'uso di ET finalizzato al controllo della PRRS. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'utilizzo degli ET come strumento per il monitoraggio della PRRS nel sistema produttivo italiano, tramite un confronto con la metodica di riferimento.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale

Lo studio ha considerato 4 allevamenti da riproduzione dislocati in Nord Italia che operavano già il monitoraggio della PRRS mediante prelievo ematico nei suinetti sottoscrofa. Sono stati scelti in modo casuale alcune nidiate da sottoporre al prelievo ematico ed alla contemporanea raccolta dei testicoli al momento della castrazione, secondo la numerosità riportata in Tabella 1 e con la corrispondenza di un pool per ogni nidiata.

Tabella 1. Distribuzione dei campioni prelevati in 4 allevamenti.
Table 1. *Distribution of samples collection in 4 farrow-to-weaning farms.*

	N° scrofe	N° suinetti	N° pool emosieri testicolari	N° prelievi sangue
Azienda 1	15	108	15	108
Azienda 2	16	68	16	68
Azienda 3	20	128	20	128
Azienda 4	20	110	20	110
Totale	71	414	71	414

Prelievo dei campioni

In ogni allevamento è stata mantenuta la normale routine di castrazione per quanto riguarda l'uso di guanti e taglienti, al fine di mantenere una situazione di campo. I soggetti selezionati sono stati sottoposti prima al prelievo ematico in singolo e successivamente alla castrazione chirurgica, il materiale derivante è stato raccolto in sacchetti di polietilene da 5 litri nuovi non sterili, ottenendo un pool per ogni nidiata, da cui andare e prelevare il cosiddetto emosiero. Tutto il materiale biologico è stato mantenuto a temperatura di refrigerazione (4°C).

Indagini di laboratorio

Gli emosieri ed il sangue sono stati portati in laboratorio entro 2 ore dal prelievo e dal fondo del sacchetto, con una siringa sterile è stato prelevato il materiale siero-ematico che nel frattempo si è raccolto. Per ottenere dai pool meno consistenti una quantità pari ad almeno 1ml di ET è stato necessario porre il campione in Stomacher® per 3 minuti a 230rpm. I campioni di sangue sono stati centrifugati a 3000rpm per 3' ed è stato raccolto il siero surnatante. L'ET ed il siero ematico sono stati aliquotati in contenitori Eppendorf® da 1,5 ml e refrigerati fino al momento dell'esecuzione dei test diagnostici. L'RNA è stato ottenuto a partire da 200 µl di campione utilizzando il kit NucleoMag® Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) mediante estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore.
La ricerca di PRRSV è stata eseguita tramite RT-PCR real time utilizzando il kit LSI VetMAX (TM) PRRSV EU/NA Real-Time PCR kit (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy), secondo le indicazioni del produttore. I risultati sono stati interpretati valutando il valore del Ciclo soglia (Ct) e considerati positivi nel caso di Ct $\leq$37. Per poter confrontare gli ET (nidiate in pool) con i sieri ematici (suinetti in singolo), una nidiata è stata considerata positiva se almeno il siero ematico di un soggetto presentava positività in PCR.

Analisi statistica
I risultati di PCR sono stati valutati mediante una tabella di contingenza (2x2) in cui sono stati messi a confronto lo status delle nidiate, basandosi sui risultati della PCR su siero ematico (analisi effettuate in singolo e valutate come positive o negative sulla nidiata) e degli ET di tutte le nidiate analizzate. Il confronto è stato eseguito mediante l'Indice di Concordanza e il valore della K di Cohen. Sensibilità e specificità sono state calcolate considerando come Gold standard i risultati ottenuti nelle nidiate dai sieri ematici.

RISULTATI E DISCUSSIONE
In tre dei quattro allevamenti è stato riscontrato l'RNA del PRRSV, evidenziando difatti un'attiva circolazione virale, i risultati riferiti alle singole nidiate sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Status delle nidiate per PRRSV: confronto tra il risultato della RT-PCR real time del siero ematico (Gold standard) e dell'emosiero testicolare (ET) nei suinetti.
Table 2. *PRRSV litters status: comparison of the RT PCR real time results between blood serum (Gold standard) and processing fluids (PF) in piglets.*

		RT-PCR real time siero ematico	
		+	-
w emosiero	+	15 (100%)	0 (0%)
	-	2 (3,6%)	54 (96,4%)

Le 71 nidiate esaminate hanno dimostrato una concordanza tra i due test del 97,2% con un valore della k di Cohen dello 0,92 (IC95%: 0,81-1,00), valore considerato ottimale e in accordo con quanto rilevato da Vilalta e coll. (2018).
Sensibilità e specificità del test sono risultate rispettivamente dell'88,2% (IC95%: 63,6-98,5%) e del 100% (IC95%: 93,4-100%), evidenziando quindi una modesta perdita di sensibilità dell'esame in pool su ET rispetto ai sieri analizzati in singolo; risultati concordi con quanto riportato da altri autori in un recente lavoro, che hanno riportato un valore di sensibilità dell'87% (IC 95%: 66–97%) e di specificità del 94% (IC95%: 85–99%) (Vilalta et al., 2018).
La perdita di sensibilità è verosimilmente attribuibile ad una diluizione del virus nei campioni in pool dovuto ad una bassa carica virale (Vilalta et al., 2018). Inoltre, la raccolta degli ET in pool potenzialmente consente di avere un campione rappresentativo di più soggetti rispetto alla raccolta di siero ematico (seppur anch'esso in pool). Inoltre, la possibilità di costituire pool da nidiate differenti, o da un numero di suinetti campionati maggiore, può comportare un rialzo delle positività conseguente ad un probabile aumento del livello di sensibilità (maggiore numero di soggetti campionati), come riportato nello Swine Disease Reporting System (2018).
Il confronto tra i principali protocolli di monitoraggio della PRRS basasti sull'esecuzione di 6 PCR mensili su siero ematico raccolto in pool di 5 suinetti e la proposta di utilizzo dei pool di ET (Tabella 3) mostra come a parità di suinetti campionati sia possibile eseguire un numero inferiore di campioni con medesima attendibilità. Si evidenzia come il campionamento di materiale biologico di "scarto" (testicoli), può ridurre il materiale consumabile necessario e le tempistiche per l'esecuzione dei campioni. Inoltre, il campionamento per ET non prevede l'esecuzione di un prelievo ematico eseguito da un

veterinario adiuvato da un operatore che contiene l'animale, ma risulta sufficiente porre in sacchetti diversi i testicoli al momento della castrazione, eseguita da un operatore appositamente formato (risparmio di risorse). Infine, il protocollo ET evita un'ulteriore procedura stressante per i suinetti, quale manipolazione, contenimento e prelievo ematico, riducendo conseguentemente l'impatto sul benessere animale.

Tabella 3. Confronto tra i protocolli per il monitoraggio della PRRS.
Table 3. *Comparison between PRRS monitoring protocols*.

Protocollo	N° suinetti / nidiata	N° nidiate mensili	N° suinetti / anno	N° soggetti / pool	N° campioni / anno	N° analisi PCR / anno
Prelievi ematici in singolo (Metodica di riferimento)	5	30	360	-	360	360
Prelievi ematici in pool	5	30	360	5	360	72 (6 pool da 5 suinetti/ mese)
Emosieri testicolari in pool	5	30	360	5	72	72 (6 pool da 5 suinetti/ mese)

CONCLUSIONI
I risultati preliminari di questo studio sul confronto, tra l'impiego di sieri ematici in singolo rispetto agli ET in pool, forniscono una valida indicazione sulla possibilità dell'uso di ET nei suinetti come valida alternativa di campionamento, evidenziato da un'eccellente concordanza dei risultati. Tuttavia, questi confronti dovranno essere estesi ad un numero maggiore di campioni per poter validare il protocollo diagnostico. L'impiego di ET risulta preferenziale, poiché prevede il campionamento di materiale biologico di "scarto", facile da prelevare, con un minimo spreco di materiali consumabili, tempo e risorse. Inoltre, l'uso del protocollo con ET non prevede ulteriori misure stressanti per i suinetti impiegate per i prelievi siero-ematici (manipolazione dei suinetti ed esecuzione del prelievo), riducendo l'impatto sul benessere animale. In conclusione, l'utilizzo di ET nel protocollo diagnostico di monitoraggio del PRRSV risulta la metodica promettente di più facile utilizzo su larga scala.

BIBLIOGRAFIA

1. Corzo, C. A., E. Mondaca, S. Wayne, M. Torremorell, S. Dee, P. Davies, and R. B. Morrison, 2010, Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Virus Res, v. 154, p. 185-92.
2. Holtkamp, D. J., D. D. Polson, M. Torremorell, B. Morrison, D. M. Classen, L. Becton, S. Henry, M. T. Rodibaugh, R. R. Rowland, H. Snelson, B. Straw, P. Yeske, J. Zimmerman, A. A. o. S. Veterinarians, and U. S. D. o. A. P.-C. A. Project, 2011, [Terminology for classifying the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) status of swine herds]: Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere, v. 39, p. 101-12.

3. Iowa, S. U., and U. Minnesota, 2018, Swine disease reporting system.
4. Jeffrey, J. Z., A. B. David, A. D. Scott, P. M. Michael, S. Tomasz, W. S. Gregory, and T. Montserrat, 2012, Diseases of Swine, Wiley-Blackwell Ames.
5. Linhares, D. C. L., 2013, Evaluation of Immune Management Strategies to Control and Eliminate Porcine
6. Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSv), Universiy of Minnesota, Saint Paul.
7. Vilalta, C., J. Sanhuezaa, J. Alvarezb, D. Murrayd, M. Torremorell, C. Corzo, and R. o. Morrison, 2018, Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs: Veterinary Microbiology, p. 149-156.

STUDIO SULLA CIRCOLAZIONE DI VIRUS INFLUENZALE TIPO A, B, C E D NEGLI ALLEVAMENTI SUINI NEL NORD ITALIA. CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS CIRCOLANTI NEGLI ANNI 2016-2018.

STUDY ON THE CIRCULATION OF INFLUENZA VIRUS TYPE A, B, C AND D IN PIG FARMS IN NORTHERN ITALY. CHARACTERIZATION OF CIRCULATING VIRUSES IN THE YEARS 2016-2018

CHIAPPONI C.[1], PROSPERI A.[1], FACCINI S.[1], MORENO A.[1], ALBORALI G.L.[1], MERENDA M.[1], LUPPI A.[1], AMORICO A.[2], BAIONI L.[1], ZANNI I.[1], MANFREDI R.[1], GABBI V.[1], FONI E[1].

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; [2]Veterinaria Gruppo Martini s.p.a.

Parole chiave: Virus influenza tipo A e D
Key words: Influenza A and D virus

RIASSUNTO
Lo studio si è proposto di indagare attraverso metodiche biomolecolari la circolazione di virus influenzali IAV, IBV, ICV e IDV negli allevamenti suini del Nord-Italia (2016-2018), al fine di poter meglio comprendere l'epidemiologia di queste infezioni nei suini. Per quanto riguarda IBV e ICV, non è stata riscontrata circolazione di questi due tipi influenzali nonostante l'elevato numero dei campioni esaminati (n. 4960). Nell'ambito della sorveglianza attiva virologica su 28 allevamenti è stata riscontrata positività per IDV in una azienda (3,5%), mentre il monitoraggio sierologico ha evidenziato positività in 3/13 siti. Dai campioni diagnostici conferiti in corso di affezioni respiratorie si è osservata positività per IDV su 8 delle 595 aziende esaminate (1,3%). La sorveglianza attiva per IAV nei suini ha dato esito positivo nel 28,5% degli allevamenti, mentre nell'ambito dell' attività diagnostica la percentuale di positività registrata è stata del 31,9%. Tra i IAV sequenziati sono stati evidenziati 14 genotipi diversi. I dati raccolti in questo studio dimostrano una bassa prevalenza di IDV nelle aziende esaminate, dimostrando che la scarsa capacità diffusiva dell'infezione. Per quanto riguarda IAV invece lo studio ne conferma l'importanza nell'insorgenza delle forme respiratorie del suino, con una marcata circolazione endemica nella popolazione. Infine lo studio filogenetico dei ceppi di IAV ha evidenziato eventi di riassortimento che sono correlabili a introduzioni in Italia di IAV dal Nord-Europa.

ABSTRACT
The aim of the study has been to investigate the circulation of influenza A, B, C and D virus (IAV, IBV, ICV and IDV) among pig herds in Northern Italy (2016-2018) using biomolecular techniques, in order to better understand the epidemiology of these infections in the Italian swine population.
IBV and ICV circulation was not observed despite the high number of the examined samples (n.4960). The active surveillance on 28 herds showed the IDV circulation only in one farm (3.5%), while 3/13 herds resulted serologically positive. Diagnostic samples collected in cases of respiratory disease were found positive for IDV in 8 of the 595 herds examined (1.3%). IAV was detected in 28.5% of herds (8 out of 28) during active surveillance, while

diagnostic activity on respiratory disease affected herds showed positivity for IAV in 306 of the 959 examined herds (31.9%). Among the sequenced IAVs, 14 different genotypes were detected. The data collected in this study allow us to consider a low positivity for IDV in the swine population, showing the poor diffusive abilities of the infection. Regarding IAV the study confirms its importance in the porcine respiratory disease complex, showing also a marked endemic circulation in the swine population. The phylogenetic study of the IAV detected in the study highlighted reassortment events, which track swine IAV introductions from North-Europe to Italy.

INTRODUZIONE

I virus influenzali A, B and C (IAV, IBV, ICV) appartengono alla famiglia *Orthomixoviridae* e sono responsabili di affezioni respiratorie nell'uomo. IAVs sono in grado di infettare anche varie specie di mammiferi e le specie aviarie. IBV è considerato un agente stagionale di infezioni nell'uomo in similitudine con IAV, mentre ICV causa lievi infezioni respiratorie delle prime vie aeree. Recentemente è stato dimostrato che IBV è in grado anche di infettare sia suini che mammiferi acquatici. ICV è stato isolato da suino in Cina ed è risultato geneticamente correlato a ICV umano (7, 25), e ne è stata dimostrata anche la trasmissibilità fra uomo e suino (11). Nel 2011 in Oklahoma un Orthomyxovirus riferibile a ICV (C/swine/Oklahoma/1334/2011) (C/OK) è stato isolato da suini affetti da forma respiratoria (9). Studi successivi hanno dimostrato la presenza e la circolazione di virus C/OK-*like* anche in bovini in USA, Cina e Francia (5, 8), e analisi genetiche hanno dimostrato che le particelle virali C/OK-*like* sono geneticamente distinte da ICV di origine umana, codificando un nuovo genere nell'ambito della famiglia *Orthomyxoviridae*, il virus influenza D (IDV). Recentemente una indagine esplorativa sulla circolazione di questo supposto nuovo genere in un limitato numero di campioni diagnostici (tamponi e polmoni) da suini e bovini (150 per specie), ha messo in evidenza la presenza di IDV negli allevamenti italiani, geneticamente simile allo stipite di riferimento C/swine/Oklahoma/1334/2011. Anche allargando le ricerche a livello internazionale si può affermare che poche e frammentarie sono le informazioni sulla origine e sulla circolazione di questo virus nella popolazione suina. Inoltre, a fronte di una ampia disponibilità di dati epidemiologici nei confronti di IAV nella specie suina in Italia, nulle sono le conoscenze sulla eventuale circolazione nell'ambito di questa specie di altri virus influenzali come IBV e ICV. L'influenza suina è annoverata tra le patologie che compongono il complesso delle patologie respiratorie del suino (PRDC), ed è considerata causa di perdite economiche per l'allevamento suino. L'infezione da virus dell'influenza A nel suino (SIAV), oltre ad avere importanti ripercussioni sanitarie, gioca anche un ruolo importante nella ecologia del virus influenzale, in quanto questa specie è suscettibile alla infezione da parte di virus influenzali aviari ed umani, ed è in grado di trasmetterli ad altre specie (12, 20, 26). Il genoma del virus influenzale A è costituito da 8 segmenti di RNA e viene convenzionalmente identificato a seconda delle caratteristiche delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) (3). La peculiare costituzione del RNA del virus influenzale è alla base della sua marcata variabilità antigenica. L'emergenza di un nuovo virus influenzale A può realizzarsi grazie a diversi meccanismi: la trasmissione inter-specie, le mutazioni antigeniche (*drift*) e il riassortimento genetico *(shift)* dovuto allo scambio di geni tra due o più virus influenzali, anche originati da specie diverse (2). Pertanto anche se i sottotipi a circolazione enzootica nella popolazione suina di tutti i continenti sono H1N1, H1N2 e H3N2, la loro origine, le loro caratteristiche antigeniche e genetiche sono molto diverse nelle varie aree geografiche e per di più all'interno di queste subiscono ulteriori evoluzioni nel tempo. Ne consegue a riguardo uno scenario estremamente complesso e in continua evoluzione (22). Lo scenario

italiano si caratterizza con la circolazione dei sottotipi: H1N1 di origine aviare a diffusione europea (H1avN1), H3N2 originato da riassortimento di virus umani e suini (H3N2) anche questo rappresentativo dei virus H3N2 circolanti in Europa, ed infine, H1N2 riassortante di virus di origine umana e suina (24). Quest'ultimo presenta infatti i geni interni derivanti da H1avN1 ma ha HA di origine umana e NA derivante da virus influenzale H3N2 umano circolante alla fine anni 90 (H1huN2hu). Questo sottotipo H1huN2hu circolante nei nostri allevamenti è inoltre caratterizzato da una doppia delezione nella regione HA1 (16), ed è andato man mano soppiantando il virus H1N2 di tipo europeo, che invece mostrava una NA di un virus influenzale circolante nei suini nel Regno Unito molti anni prima della stabilizzazione del sottotipo H3N2 avvenuta negli anni '80 (13, 27). A partire dal 2009 si è osservata anche la circolazione del sottotipo A(H1N1)pdm09 (17) e di numerose tipologie di riassortanti di questo stipite con i sottotipi endemici in Europa (4, 24). Studi recenti hanno messo in evidenza la frequente introduzione di virus di origine umana in popolazioni suine negli Stati Uniti e in Brasile (1, 18, 19). Vista l'alta variabilità dei virus influenzali di tipo A è importante monitorare la circolazione dei virus influenzali fra specie diverse e la possibilità di trasmissione di questi virus tra animali e uomo e viceversa.

MATERIALI E METODI

Campionamento. Nel periodo 2016-2018 sono stati raccolti 4960 campioni (tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare) da suini appartenenti a 959 allevamenti delle Regioni Emilia Romagna, Lombardia, Veneto, affetti da forme cliniche respiratorie.

Nello stesso periodo, nell'ambito del programma previsto dall'attività di sorveglianza attiva, sono stati monitorati con cadenza quadrimestrale 28 allevamenti delle Regioni Lombardia ed Emilia Romagna. Per questa attività di monitoraggio sono stati campionati, mediante tampone nasale, quattro diverse tipologie produttive: scrofe, suinetti sottoscrofa, svezzati e magroni, per un totale di 503 campioni. Sempre nell'ambito della sorveglianza attiva campioni di sangue appartenenti a 173 scrofe sono stati prelevati in 13 allevamenti.

Test molecolari e virologici. Specifici *primers* di sequenziamento sono stati disegnati per mettere a punto e/o migliorare i test diagnostici in PCR per la rilevazione di IBV, ICV, IDV da campioni clinici animali. Al fine di potere amplificare più virus influenzali a partire da RNA estratto da matrici biologiche, la metodica di rilevazione di IDV in real-time PCR descritta da Faccini *et al* 2017 (6) è stata modificata e implementata. Sono stati selezionati ulteriori combinazioni di *primers* e sonde in grado di rilevare in modo specifico ICV e IBV (14, 23) come *multiplex Reverse transcriptase real-time* PCR.

I campioni biologici di origine suina (tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare), provenienti da sorveglianza sia attiva che passiva, sono stati quindi testati per la presenza di IDV, IBV, ICV con la metodica sopra descritta e per IAV come descritto in precedenza (4). I campioni risultati positivi (IAV e IDV) sono stati inoculati su colture cellulari ai fini dell'isolamento virale. Una selezione di campioni positivi è stata sottoposta a sequenziamento dell'intero genoma con tecnica NGS Illumina (4). In breve, l'intero genoma è stato analizzato suddiviso nei singoli 8 segmenti genetici per IAV e 7 segmenti per IDV. Il lineaggio di ciascun segmento è stato determinato mediante analisi in Blast verso i virus influenzali IAV e IDV presenti in GenBank. I vari genotipi di IAV scaturiti dalla diversa combinazione di geni sono stati numerati progressivamente così come descritto in precedenza (4, 21) e sono state eseguite analisi filogenetiche (15).

Indagine sierologica. Nell'ambito delle attività previste da sorveglianza attiva per IDV i campioni di sangue sono stati esaminati per la ricerca di anticorpi nei confronti di virus Influenza D con tecnica HI (8).

RISULTATI

Indagine virologica. I risultati della sorveglianza virologica attiva e passiva sono riportati in Tabella 1. E' stata riscontrata positività per IDV in una soltanto delle 28 aziende esaminate nell'ambito dei prelievi di sorveglianza attiva (3,5%), mentre nei campioni diagnostici conferiti per accertamenti in corso di affezioni respiratorie in allevamento si è osservata positività su 8 delle 595 aziende esaminate (1,3%). Le prove di isolamento su colture cellulari, a partire dai campioni risultati positivi in PCR per IDV, hanno permesso l'isolamento di 4 ceppi di IDV, due dei quali sono stati sequenziati completamente. Dal punto di vista filogenetico questi virus risultano correlati a IDV isolati da bovino sul nostro territorio, delineando quello che può essere considerato un cluster genetico a sé stante.

Per quanto riguarda gli altri tipi influenzali oggetto dell'indagine, a fronte di un totale di 4960 campioni suini esaminati, non è stata rilevata alcuna positività nei confronti di IBV e ICV, mentre la sorveglianza attiva ha messo in evidenza la presenza di IAV nel 28,5% degli allevamenti oggetto di indagine (8 aziende positive su 28), mentre quella passiva ha evidenziato una positività del 31,9% (306 aziende positive su 959) (Tabella 1). L'incidenza dei vari sottotipi ottenuta sia con la sorveglianza attiva che quella passiva, è riportata in Tabella 1.

Una selezione di 157 campioni positivi appartenenti ai vari sottotipi di IAV sono stati sottoposti ad analisi genetica, che ha permesso, in base al lineaggio di appartenenza di ciascun segmento genico, di classificare in 14 genotipi diversi i virus IAV circolanti negli allevamenti suini del Nord Italia. L'analisi delle combinazioni dei segmenti genici rilevate è stata riassunta nella Figura 1.

I ceppi H3N2 si confermano il sottotipo più conservato ed inoltre non è stato possibile evidenziare eventi di riassortimento genetico con altri sottotipi.

Anche fra i ceppi del sottotipo H1N1 non sono stati evidenziati ceppi riassortanti nel 2017, mentre nel 2018 è stato rilevato solo un ceppo con gene M derivato dal virus A(H1N1) pdm09. Tuttavia è stato possibile osservare la circolazione di stipiti con segmenti genici simili a quelli circolanti in Nord Europa, evidentemente introdotti con la movimentazione di animali e in aumento come presenza sul territorio italiano.

Il sottotipo H1N2 si è rivelato il più variabile e complesso come combinazione di geni con più del 50% dei ceppi appartenenti ad un genotipo riassortante, che si discosta dal classico genotipo italiano che ha circolato fino circa al 2010. Solo grazie al sequenziamento integrale del genoma è stato possibile evidenziare segmenti di origine A(H1N1)pdm09 come geni interni di sottotipi H1N2. L'utilizzo di virus di riferimento, isolati da varie nazioni europee e non, per la costruzione di alberi filogenetici ha permesso di visualizzare un flusso di geni che rispecchia la localizzazione geografica. All'interno di questi gruppi sono stati posizionati i geni codificanti per le emoagglutinine dei sottotipi H1N1 e H1N2 appartenenti ai virus italiani suini dello studio (Figure 2a e 2b).

Analisi sierologiche. Nell'ambito della sorveglianza attiva sono stati esaminati i sieri di scrofe per IDV tramite metodo di inibizione dell'emoagglutinazione. Solo 3 allevamenti dei 13 monitorati hanno presentato soggetti con anticorpi nei confronti di IDV, e complessivamente i sieri con reattività erano 5/173 (2,8%), inoltre tali positivi presentavano titoli anticorpali molto bassi (1:20 e 1:40).

Tabella 1. Risultati della sorveglianza virologica attiva e passiva per IAV e IDV in campioni suini. Sono riportate le percentuali di circolazione di ciascun sottotipo virale IAV.
Table 1. Summary of results of active and passive virological surveillance for IAV, and IDV in swine farms. Percentages of circulation of each IAV subtype are shown.

SORVEGLIANZA	AZIENDE ESAMINATE	AZIENDE POSITIVE	POSITIVITA' per aziende %	% H1N1	% H1N2	% H3N2	% H3N1	% H1N1 PDM09	% Non tipizzati
ATTIVA IAV	28	8	28,5	17,6	58,8	11,8	0,0	5,9	5,9
PASSIVA IAV	959	306	31,9	29,5	29,0	13,6	0,3	2,2	25,3
ATTIVA IDV	28	1	3,5	/	/	/	/	/	/
PASSIVA IDV	595	8	1,3	/	/	/	/	/	/

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Le numerose analisi eseguite nel corso dello studio permettono di affermare una assenza di circolazione di virus IBV e ICV negli allevamenti suini italiani. In realtà, se il dato non ci stupisce per quanto riguarda ICV, vista la scarsa circolazione anche nell'uomo, ci si sarebbe potuto aspettare un qualche riscontro di positività per IBV, visto la discreta percentuale di casi accertati nell'uomo nelle ultime 4 stagioni influenzali (17%), come riportato dall'Istituto Superiore di Sanità. Per quanto riguarda invece l'infezione da IDV i dati raccolti in questo studio ci permettono di considerare che negli allevamenti suini se pur presente (positività nell'1,4% delle 623 aziende esaminate), rappresenta una infezione con scarse capacità diffusive: 12 campioni positivi su 4960 esaminati (0,2%). Uno studio simile condotto nello stesso periodo in Germania ci fornisce dati ulteriormente contenuti per quanto riguarda IDV, 1 solo campione positivo su 4033 esaminati, mentre per IBV sono state osservate due positività sullo stesso numero di casi esaminati, soltanto con prove biomolecolari, senza possibilità di isolamento virale (10). Per quanto invece riguarda IAV lo studio conferma invece la pesante incidenza del virus influenzale nell'insorgenza delle forme respiratorie del suino: 31,9% di positività delle aziende esaminate (n.959). Tuttavia questo valore si abbassa di poco (28,5%) qualora si vada a testare per la circolazione di IAV periodicamente, in questo caso 3 volte/anno, gli allevamenti, indipendentemente dalla presenza o meno di forme respiratorie. E questo anche se il numero di osservazioni è alquanto ridotto: 84 ingressi in allevamento (n. 28). Questa osservazione conferma la circolazione endemica di virus influenzale nella popolazione suina senza che si presentino forme cliniche apprezzabili. In particolare modo è interessante notare la maggiore circolazione di sottotipo H1N2, che è stato rilevato nel 58,8% dei casi positivi (Tabella 1). Per quanto riguarda l'incidenza dei vari sottotipi da forme respiratorie, si è osservato che il 29% è rappresentato da H1N2, il 29,5% da H1N1, il 13,6% da H3N2 e il 2,2% da A(H1N1)pdm09 (Tabella 1). Il 25% circa dei positivi IAV è risultato non tipizzabile tramite metodica PCR Multiplex e per l'approfondimento del genotipo si è ricorso alla sequenza del genoma totale.

Gli aspetti però più interessanti dell'epidemiologia di IAV nei nostri allevamenti suini scaturiscono dall'analisi genetica eseguita su 157 stipiti selezionati. Infatti gli stipiti appartenenti ai tre sottotipi sono stati a loro volta ascritti a ben 14 genotipi diversi, in base all'attribuzione dei lineaggi per ciascun segmento genico considerato (Figura 1). Si osserva la stessa incidenza di H1N1 e H1N2 nell'ambito delle attività di sorveglianza passiva. Per quanto riguarda gli H1N1 (genotipo 1) si è osservata una consistente circolazione di stipiti di origine Nord Europea, con geni simili a quelli di virus segnalati ad esempio in Olanda (Figura 2a).

La variabilità genetica più accentuata si osserva nell'ambito del sottotipo H1N2 per il quale

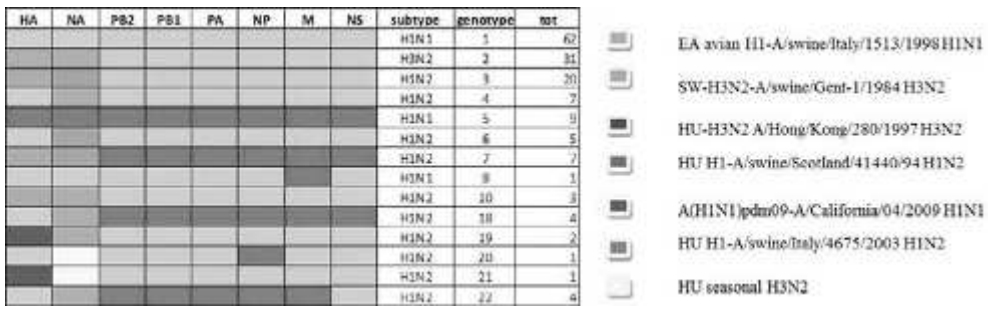
sono stati riscontrati 10 diversi genotipi (Figura 1). Si conferma presente sul territorio l'H1N2 genotipo 3, già descritto in passato, con HA derivata dal ceppo A/swine/Italy/4675/2003. A questo virus tuttavia si affiancano dei sempre maggiori genotipi riassortanti, sia di origine italiana (13% con il genotipo 7) sia di origine europea (7,4% con il genotipo 18 e 7,4% con il genotipo 22), con emoagglutinina di origine aviare e geni interni di origine A(H1N1)pdm09 (Figura 1, 2b).

Questi dati confermano studi precedenti sulla presenza di stipiti riassortanti con virus Nord Europei (4), dimostrandone la crescente incidenza. Tale riscontro trova ragione nell'aumentata introduzione in Italia di suini vivi da altri paesi Europei negli ultimi tre anni: mentre è rimasta invariata l'introduzione in Italia dai maggiori produttori e fornitori di suini, quali Olanda e Danimarca, è aumentato di circa il 50% l'*import* da Spagna, Francia e Croazia, del 67% dalla Germania e addirittura dalla Polonia il valore delle importazioni di suini vivi è quadruplicato (fonte: http:/www.intracen.org/).

Ancora una volta la circolazione di virus influenzali nel suino dimostra una elevata variabilità e frequenza di riassortimenti, che sono in grado di generare repentinamente stipiti geneticamente e antigenicamente nuovi per la popolazione suina così come per la popolazione umana. Alla luce dell'importanza dei virus influenzali nella PRDC del suino ed in ragione del loro potenziale zoonosico, conoscere e tracciare questa variabilità è alla base di una sorveglianza epidemiologica efficiente. Inoltre tale variabilità può limitare l'efficacia degli strumenti diagnostici routinari, nel caso in cui questi non siano opportunamente rivisti ed aggiornati, sfruttando le informazioni ottenute dalla sorveglianza attiva e passiva svolta sul nostro territorio nazionale.

Figura 1. Genotipi di IAV rilevati mediante sequenziamento NGS di 157 virus appartenenti ai tre sottotipi influenzali H1N1, H1N2, H3N2. I colori indicano il lineaggio attribuito al segmento genico considerato e le diverse combinazioni di geni rilevate nei virus sequenziati sono state nominate con numerazione progressiva**.**

Figure 1. IAV genotypes detected by NGS sequencing of 157 viruses (H1N1, H1N2, H3N2). Different lineages of genetic segments are described by different colors and their combinations are differentiated by numbering.



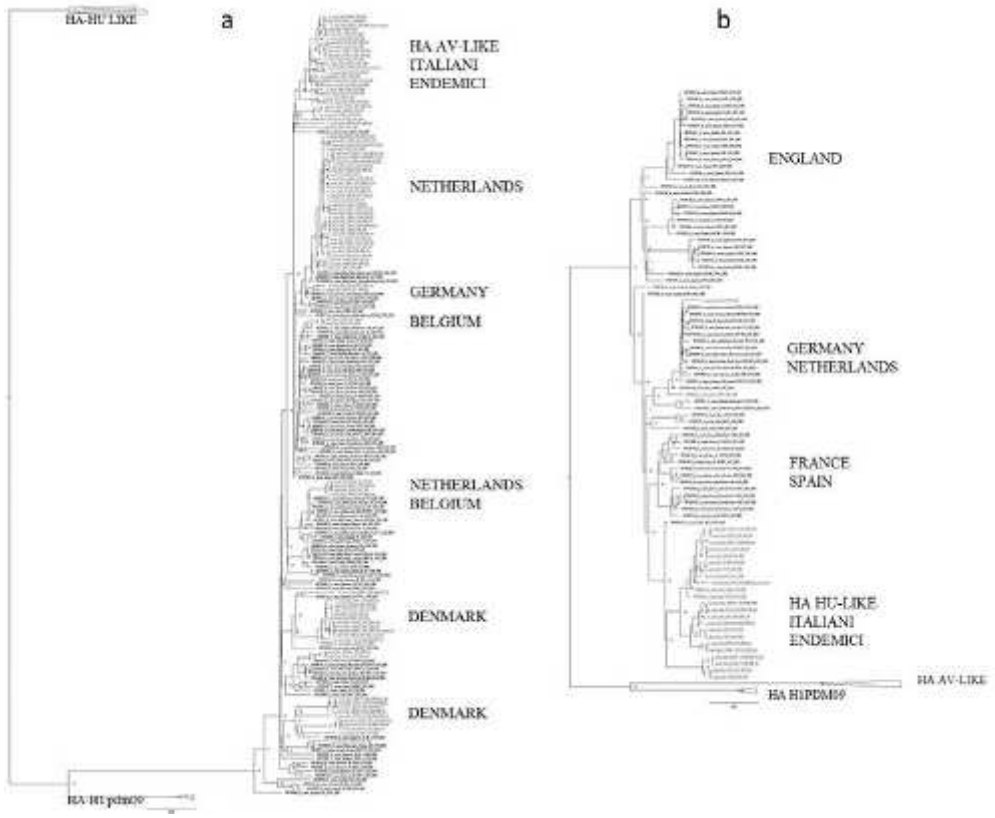


Figura 2. Albero filogenetico del gene codificante per HA, sottotipo H1 dei virus IAV sequenziati nel periodo 2016-2018 confrontati con virus italiani ed europei. a) particolare relativo al ramo H1 avian-like. b) particolare relativo al ramo H1 human-like. In rosso sono riportate le sequenze italiane. In blu virus di riferimento.

Figure 2. Phylogenetic tree of the gene encoding for HA, subtype H1, of the IAVs sequenced in the period 2016-2018 compared with Italian and European viruses. a) detail related to the avian-like H1 branch. b) detail related to the human-like H1 branch. The Italian sequences are shown in red whilst reference viruses are in blue.

RINGRAZIAMENTI. Lo studio è stato in parte finanziato da Ricerca Corrente Ministero della Salute PRC2015006

BIBLIOGRAFIA

1. Bowman A.S., Nelson S.W., Page S.L., Nolting J.M., Killian M.L., Sreevatsan S., et al. (2014) Swine-to-human transmission of influenza A(H3N2) virus at agricultural fairs, Ohio, USA, 2012. Emerg Infect Dis Sep;20(9):1472-80.
2. Brown I.H. (2013) History and epidemiology of Swine influenza in Europe. Curr Top Microbiol Immunol;370:133-46.
3. Cheung T.K., Poon L.L. (2007) Biology of influenza a virus. Ann N Y Acad Sci Apr;1102:1-25.
4. Chiapponi C., Ebranati E., Pariani E., Faccini S., Luppi A., Baioni L., et al. (2017) Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy

during 2010-2015 Zoonoses Public Health.
5. Ducatez M.F., Pelletier C., Meyer G. (2015) Influenza D virus in cattle, France, 2011-2014. Emerg Infect Dis Feb;21(2):368-71.
6. Faccini S., De Mattia A., Chiapponi C., Barbieri I., Boniotti M.B., Rosignoli C., et al. (2017) Development and evaluation of a new Real-Time RT-PCR assay for detection of proposed influenza D virus J Virol Methods. ;243:31-4.
7. Guo Y.J., Jin F.G., Wang P., Wang M., Zhu J.M. (1983) Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. J Gen Virol Jan;64 (Pt 1)(Pt 1):177-82.
8. Hause B.M., Collin E.A., Liu R., Huang B., Sheng Z., Lu W., et al. (2014) Characterization of a novel influenza virus in cattle and Swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. MBio Mar 4;5(2):e00031-14.
9. Hause B.M., Ducatez M., Collin E.A., Ran Z., Liu R., Sheng Z., et al. (2013)Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. PLoS Pathog Feb;9(2):e1003176.
10. Henritzi D., Hoffmann B., Wacheck S., Pesch S., Herrler G., Beer M., et al. .(2018) A newly developed tetraplex real-time RT-PCR for simultaneous screening of influenza virus types A, B, C and D. Influenza Other Respir Viruses Sep 28.
11. Kimura H., Abiko C., Peng G., Muraki Y., Sugawara K., Hongo S., et al. (1997) Interspecies transmission of influenza C virus between humans and pigs. Virus Res Apr;48(1):71-9.
12. Kuntz-Simon G., Madec F. . 2009Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. Zoonoses Public Health Aug;56(6-7):310-25.
13. Marozin S., Gregory V., Cameron K., Bennett M., Valette M., Aymard M., et al. (2002) Antigenic and genetic diversity among swine influenza A H1N1 and H1N2 viruses in Europe. J Gen Virol Apr;83(Pt 4):735-45.
14. Matsuzaki Y., Ikeda T., Abiko C., Aoki Y., Mizuta K., Shimotai Y., et al. (2012)Detection and quantification of influenza C virus in pediatric respiratory specimens by real-time PCR and comparison with infectious viral counts J Clin Virol. ;54(2):130-4.
15. Minh B.Q., Nguyen M.A., von Haeseler A. (2013) Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. Mol Biol Evol May;30(5):1188-95.
16. Moreno A., Chiapponi C., Boniotti M.B., Sozzi E., Foni E., Barbieri I., et al. .(2012) Genomic characterization of H1N2 swine influenza viruses in Italy. Vet Microbiol May 4;156(3-4):265-76.
17. Moreno A., Di Trani L., Alborali L., Vaccari G., Barbieri I., Falcone E., et al. (2010) First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. Open Virol J May 5;4:52-6.
18. Nelson M.I., Stratton J., Killian M.L., Janas-Martindale A., Vincent A.L. .(2015) Continual Reintroduction of Human Pandemic H1N1 Influenza A Viruses into Swine in the United States, 2009 to 2014. J Virol Jun;89(12):6218-26.
19. Nelson M.I., Wentworth D.E., Das S.R., Sreevatsan S., Killian M.L., Nolting J.M., et al. (2016) Evolutionary Dynamics of Influenza A Viruses in US Exhibition Swine. J Infect Dis Jan 15;213(2):173-82.
20. Olsen C.W., Brown I.H., Easterday B.C., Van Reeth K. (2006) Swine influenza ;Straw BE,.
21. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol Oct;28(10):2731-9.
22. Vincent A., Awada L., Brown I., Chen H., Claes F., Dauphin G., et al. (2014) Review of influenza A virus in swine worldwide: a call for increased surveillance and research. Zoonoses Public Health Feb;61(1):4-17.
23. Ward C.L., Dempsey M.H., Ring C.J., Kempson R.E., Zhang L., Gor D., et al. (2004) Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement J Clin Virol. ;29(3):179-88.
24. Watson S.J., Langat P., Reid S.M., Lam T.T., Cotten M., Kelly M., et al. (2015) Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. J Virol Oct;89(19):9920-31.
25. Yuanji G., Desselberger U. (1984) Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. J Gen Virol Nov;65 (Pt 11)(Pt 11):1857-72.
26. Zell R., Scholtissek C., Ludwig S. (2013) Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. Curr Top Microbiol Immunol;370:29-55.
27. Zell R., Scholtissek C., Ludwig S. (2013) Genetics, Evolution, and the Zoonotic Capacity of European Swine Influenza Viruses. Swine Influenza;370:29-55.

POLMONITE ENZOOTICA: MONITORAGGIO DELLE LESIONI BRONCOPOLMONARI IN SUINI MACELLATI NEL PERIODO 2012-2018

UPDATE ON THE MONITORING OF ENZOOTIC PNEUMONIA LIKE LESIONS IN ITALIAN SLAUGHTERED PIGS IN 2012-2018

PANGALLO G., BONILAURI P., DE LORENZI G., LUPPI A., DOTTORI M.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Parole chiave: lesioni polmonari, macello, *Mycoplasma hyopneumoniae*
Key words: pulmonary lesions, slaughterhouse, *Mycoplasma hyopneumoniae*

RIASSUNTO

Nel periodo Febbraio 2012-Dicembre 2018 55034 suini di 534 partite appartenenti ad allevamenti del nord Italia sono stati sottoposti a score polmonare, per lesioni riferibili a polmonite enzootica (EP like lesions), impiegando il metodo Madec modificato. L'applicazione della griglia Madec nel periodo in esame ha evidenziato la presenza di lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica in 25234 soggetti (45,9%). Il valore medio ottenuto considerando tutti i polmoni sottoposti a punteggiatura nel periodo considerato è stato di 1,09 con valore minimo e massimo tra tutte le partite punteggiate rispettivamente di 0,09 e 7,39. Il valore medio ottenuto nel periodo 2012-2018 non è risultato essere significativamente differente rispetto a quello ottenuto nel periodo 2010-2012. Questi dati evidenziano una stazionarietà sia dell'incidenza sia della gravità delle lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica al macello in un periodo di circa 8 anni.

I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2012-2018 sono stati inoltre organizzati in 4 categorie o quartili: < 0,65 quarto migliore; 0,65 – 0,91 quarto intermedio migliore; 0,91 – 1,31 quarto intermedio peggiore; > 1,31 quarto peggiore. Questa suddivisione permetterà di classificare una determinata partita sulla base del proprio valore medio rispetto ad una popolazione di suini rappresentativa di una determinata area geografica, come quella oggetto dello studio.

ABSTRACT

In the period February 2012-December 2018 55034 pigs belonging to 534 batches of pig farms located in northern Italy were scored for enzootic pneumonia (EP) like lesions using the modified Madec method. The application of the Madec grid during the period under examination highlighted the presence of pulmonary lesions related to enzootic pneumonia in 25234 subjects (45,9%). The mean value obtained considering all the lungs observed during this period was 1.09 with minimum and maximum value respectively of 0,09 and 7,39. The average value obtained in the period 2012-2018 did not turn out to be significantly different from that obtained in the period 2010-2012. These data did not show significant changes both in the incidence and in the severity of lung lesions suggestive of enzootic pneumonia at slaughter over a period of about 8 years.

The average values obtained from the batches scored in the period 2012-2018 were also organized into 4 categories or quartiles: <0,65 best quarter; 0,65 – 0,91 fourth best intermediate; 0,91 – 1,31 fourth worst intermediate; > 1,31 worst quarter.

The distribution in classes of EP average values obtained from lungs belonging to 55034 pigs can be used as a tool for ranking a batch in respect of the general population of a specific geographical area.

INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) costituisce uno dei più importanti problemi dell'allevamento suino a livello mondiale sia dal punto di vista sanitario sia zootecnico. Le cause sono multifattoriali: interazione di agenti patogeni a eziologia primaria o secondaria (virus, micoplasmi e batteri), condizioni ambientali non ottimali, fattori legati all'ospite (suscettibilità individuale e immunità di popolazione) e all'azienda (livello di biosicurezza aziendale). Le perdite economiche associate al PRDC sono rilevanti: si stima che la perdita funzionale anche solo del 10% del parenchima può portare ad una riduzione delle performances produttive in termini di incremento ponderale giornaliero e conversione alimentare (*M. hyopneumoniae* 17% e 14%, *A. pluropneumoniae* 34% e 26% rispettivamente) (Meyns et al., 2011). Le broncopolmoniti osservabili nel suino ai lobi craniali (apicali) e cardiaci dei polmoni, denominate anche "enzootic pneumonia like lesions", sono provocate principalmente dall'infezione di *Mycoplasma hyopneumoniae* complicata da patogeni batterici di irruzione secondaria (nella maggior parte dei casi *Pasteurella multocida*) (Sørensen V. et al., 2006).

La sorveglianza della malattia respiratoria nel suino tramite lo score polmonare al macello è frequentemente utilizzata per stimare l'incidenza delle lesioni pleuriche e di quelle broncopolmonari. I risultati di studi di monitoraggio delle lesioni polmonari al macello, condotti nei diversi paesi Europei, hanno evidenziato percentuali di lesioni broncopolmonari nei suini macellati variabili: 46,3% in Italia (Merialdi et al., 2012), 23,8% in Belgio (Meyns et al., 2010) e 55,7% in Spagna (Fraile et al., 2009). Il macello costituisce quindi la sede dove poter eseguire valutazioni di tipo sanitario sugli animali macellati. In questa sede, infatti, è possibile raccogliere importanti informazioni che sono il risultato dell'interazione tra l'animale, l'ambiente e gli agenti patogeni durante l'intero ciclo produttivo. La valutazione delle lesioni broncopolmonari al macello si basa sull'applicazione di sistemi o griglie di punteggiatura standardizzate da diversi autori (Madec e Kobisch, 1982; Morrison et al., 1985; Christensen et al., 1999) e successivamente applicate e modificate. Il metodo scelto per la punteggiatura delle lesioni polmonari al macello dovrebbe rispondere a tre fondamentali requisiti: 1) essere adeguato alla velocità della catena di macellazione (ad es. 300-400 suini/ora); 2) facilmente riproducibile e ripetibile; 3) fornire un risultato facilmente interpretabile e comparabile.

Gli obiettivi del presente lavoro sono:

1. Condurre uno studio comparativo tra le osservazioni condotte al macello nel periodo 2010-2012 con quelle ottenute nel periodo 2012-2018.
2. Fornire informazioni ed elementi utili alla corretta interpretazione e al confronto dei risultati ottenuti dalla valutazione delle lesioni broncopolmonari al macello con l'impiego della griglia Madec.

MATERIALI E METODI

Tra Febbraio 2012 e dicembre 2018 55034 suini di 534 partite appartenenti ad allevamenti del nord Italia sono stati sottoposti a score polmonare impiegando il metodo Madec modificato (Dottori et al. 2004) per la valutazione di lesioni broncopolmonari compatibili con polmonite enzootica (EP). Gli allevamenti da cui provengono le partite sopraccitate sono situati in Pianura Padana e finalizzati alla produzione del suino pesante (peso medio di macellazione 160 kg). La punteggiatura è stata effettuata in maniera casuale durante il periodo in oggetto così come casuali sono stati i macelli in cui sono stati effettuati i rilevamenti. Nello studio sono state incluse al massimo tre partite per ogni allevamento e valutati i polmoni di circa 100 animali/partita. Alla catena di macellazione le lesioni riferibili a polmonite enzootica sono state sottoposte a valutazione utilizzando il metodo

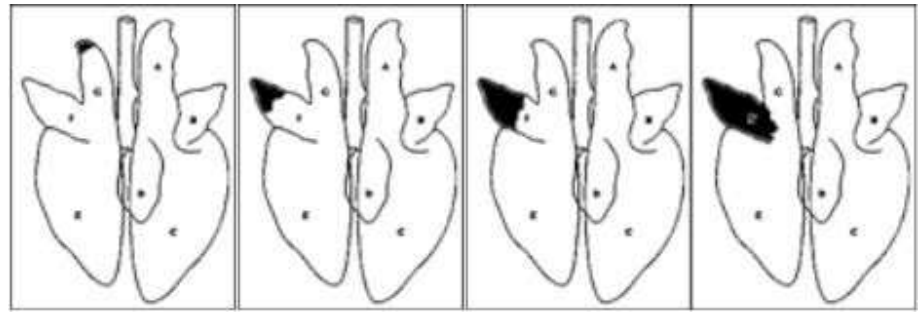
Madec modificato (tabella 1 e figura 1).

La Tabella 1 illustra i principi di valutazione su cui si basa la griglia Madec da noi applicata, con l'indicazione del punteggio assegnato in relazione alla tipologia della lesione.

Tabella 1: griglia Madec modificata (Dottori et al. 2004) per la valutazione delle lesioni riferibili a polmonite enzootica.
Table1: the Madec's grid for Enzootic pneumonia like lesions evaluation, slightly modified (Dottori et al. 2004).

PUNTEGGIO ASSEGNABILE AD OGNI LOBO	ESTENSIONE DELLE LESIONI
0	ASSENZA
1	DA 0 A 25% DEL LOBO
2	DA 26 A 50% DEL LOBO
3	DA 51 A 75% DEL LOBO
4	DA 76 A 100% DEL LOBO

Figura 1: esempi di distribuzione delle lesioni in relazione ai quattro punteggi assegnabili.
Figure 1: examples of the lesions distribution related to the lobe scores.



Schema polmoni di suino: vista dorsale. A. Lobo apicale dx; B. Lobo cardiaca dx;
C. Lobo diaframmatico dx; D. Lobo azigos; E. Lobo diaframmatico sx; F. Lobo cardiaco sx;
G. Lobo apicale sx;

I dati ottenuti dall'applicazione della griglia Madec su una partita di polmoni di suino permette di calcolare il valore medio della partita (somma dei singoli score polmonari/ numero di polmoni valutati) che descrive il grado generale delle lesioni riferibili a polmonite enzootica della partita stessa.

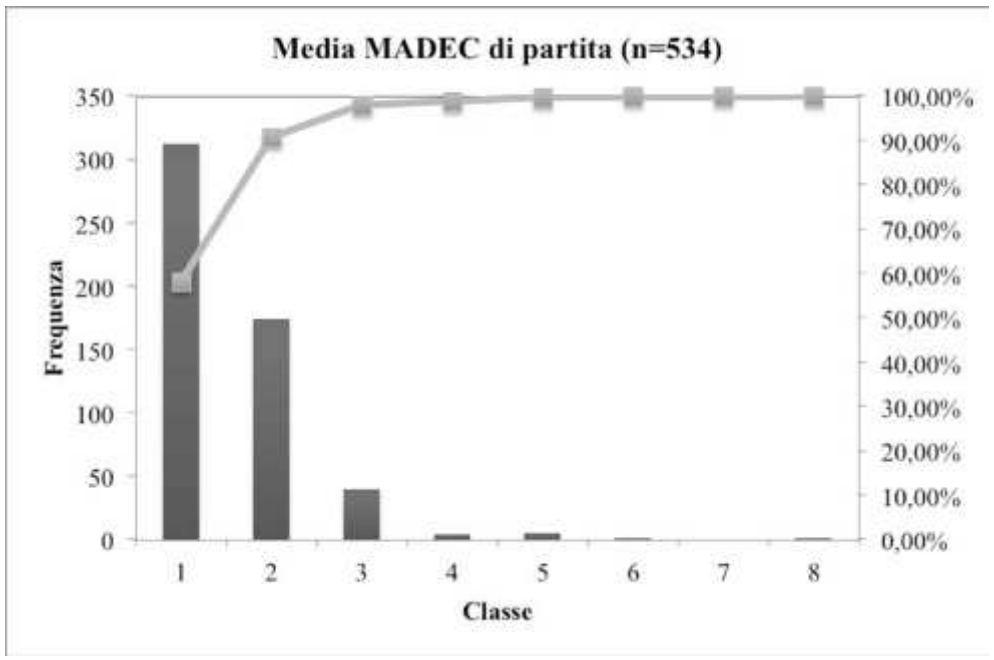
Il valore medio (media EP) di ogni partita punteggiata è stato utilizzato per calcolare il valore medio globale per ognuno dei due periodi oggetto dello studio (2010-2012 e 2012-2018), considerando all'interno di questi tutti i polmoni punteggiati come facenti parte di un'unica partita. I due valori medi globali così ottenuti sono stati confrontati utilizzato il test ANOVA.

I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2012-2018 sono stati inoltre organizzati in 4 categorie (o quartili), andando ad aggiornare i risultati ottenuti nelle indagini precedenti.

ANALISI STATISTICA
Statistica descrittiva: i punteggi polmonari medi di partita sono stati considerati appartenenti al medesimo universo statistico e sono stati utilizzati per il calcolo della media generale riferita a tutte le partite punteggiate, indipendentemente dal periodo di raccolta e dal proprietario della partita. La distribuzione delle medie di partita è stata suddivisa in 4 quartili di numerosità identica. Tutti i punteggi polmonari medi di partita sono stati rappresentati attraverso un istogramma per classi di frequenza con classi di ampiezza 1.
La media delle partite raccolte per questo lavoro e quelle precedentemente pubblicate (Luppi et al. 2013) sono state confrontate tramite test ANOVA ad una via con $p<0.05$.

RISULTATI
L'applicazione della griglia Madec nel periodo 2012-2018 su 534 partite per un totale di polmoni di 55034 suini macellati ha evidenziato la presenza di lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica in 25234 casi (45,9%). Le 534 partite hanno ottenuto in media uno score di 1,09 con valore minimo e massimo tra tutte le partite punteggiate rispettivamente di 0,09 e 7,39. Nella figura 2 è rappresentata la distribuzione delle medie di partita rappresentate per classi omogenee di valore 1 e la frequenza cumulata. Il 90% delle partite punteggiate presentava una media uguale o inferiore a 2.

Figura 2: Istogramma per classi omogenee di ampiezza 1 e frequenza cumulata delle medie di partita nel periodo 2012-2018 (534 partite per un totale di 55034 suini macellati).
Figure 2: Histogram for homogeneous classes of amplitude 1 and cumulative frequency of the match averages for the period 2012-2018 (534 matches for a total of 55034 pig carcases).



La stessa valutazione era stata fatta sui polmoni di 15174 suini nel periodo 2010-2012, riscontrando le lesioni riferibili a polmonite enzootica in 6976 soggetti (45,9%) e un valore medio globale di 1,07 con valori minimi e massimi rispettivamente di 0,16 e 3,11 (Luppi et al., 2013). Il valore medio ottenuto nel periodo 2012-2018 non è risultato essere significativamente differente ($p>0.05$) rispetto al periodo 2010-2012.
I valori medi ottenuti dalle partite nel periodo 2012-2018 sono stati distribuiti in quattro quartili di eguale ampiezza (figura 3):

- < 0,65 quarto migliore
- 0,65 – 0,90 quarto intermedio migliore
- 0.91 – 1,30 quarto intermedio peggiore
- > 1,31 quarto peggiore

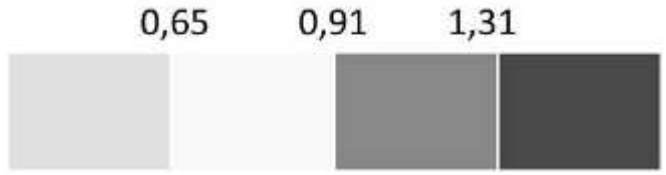


Figura 3: Distribuzione delle medie dei punteggi polmonari (polmoni appartenenti a 55034 punteggiati nel periodo 2012-2018) in quattro quartili: valore medio <0,65 (quarto migliore delle aziende campionate); valore medio tra 0,65 e 0,91 (quarto intermedio migliore delle aziende campionate); valore medio tra 0,91 e 1,31 (quarto intermedio peggiore delle aziende campionate); valore medio >1,31 (quarto peggiore delle aziende campionate.)
Figure 3: Distribution of average values in four classes: < 0,65 (best quarter); from 0,65 to 0,91 (intermediate best quarter); from 0,91 to 1,31 (intermediate worst quarter); > 1,31 (worst quarter).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE
I risultati ottenuti nel presente lavoro forniscono un dato di notevole importanza circa l'incidenza e la gravità delle lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica nel periodo 2012-2018 riscontrate in suini all'età di macellazione. Durante il periodo in esame il 45,9% dei soggetti esaminati presentava lesioni con un punteggio >=1 in accordo con la griglia Madec (Tab.1). Un dato, questo, quasi sovrapponibile ai risultati ottenuti nel periodo 2010-2012 (45,9%) e a quelli riportati da Merialdi et al. in Italia (2012) in cui la prevalenza delle lesioni broncopolmonari riferibili a polmonite enzootica osservate era del 46,3%. Le prevalenze osservate nel periodo 2010-2012 e 2012-2018, dunque, non risultano diverse da un punto di vista statistico, mostrando un trend stazionario e costante negli anni. Per quanto riguarda la gravità delle lesioni osservate, anche in questo caso non vi è nessuna differenza significativa in quanto i valori medi (media EP) rilevati nei due periodi in esame sono pressoché sovrapponibili (2010-2012: 1,07; 2012-2018: 1,09) così come sovrapponibile risulta la suddivisione in quartili delle partite punteggiate. Il presente lavoro conferma quindi i dati relativi a frequenza e gravità delle lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica precedentemente pubblicati (Luppi et al., 2013).
I dati ottenuti evidenziano quindi una condizione statica rispetto alle precedenti osservazioni (Luppi et al 2013) confermando l'interruzione del trend di miglioramento che si era osservato fino al 2012. Infatti, nella prima rilevazione su scala nazionale pubblicata da Ostanello et al., nel 2007 (periodo di riferimento: 2004-2005), le lesioni polmonari erano state riscontrate nel 59,6% degli animali con media EP 2.11. A questo studio hanno fatto seguito due indagini riferite

ai periodi 2004-2009 (50,9% media 1.4) e 2010-2012 (45,9% media 1.09) (Luppi et al., 2013) ed infine la presente pubblicazione dove la situazione è rimasta pressoché identica rispetto alla rilevazione precedente. Nonostante la larga diffusione della vaccinazione per *Mycoplasma hyopneumoniae*, la polmonite enzootica rimane un reperto comune al macello e sulla base delle rilevazioni descritte in questo lavoro e in studi precedenti, gli indici riportati (prevalenza e indice medio EP) probabilmente costituiscono un obiettivo difficilmente migliorabile con il solo impiego della vaccinazione. A questo proposito si ribadisce la necessità dell'impiego integrato di tutti gli strumenti disponibili per il controllo della malattia respiratoria che vedano un miglioramento del benessere animale, in particolare delle condizioni ambientali di allevamento, e della biosicurezza, soprattutto attraverso il controllo delle infezioni predisponenti e secondarie che intervengono nel determinismo della PRDC.

BIBLIOGRAFIA

1. Christensen, G., Enoe, C. (1999). The prevalence of pneumonia, pleuritis, pericarditis and liver spots in Danish slaughter pigs in 1998, including comparison with 1994. Danish Veterinary Journal 82, 1006–1015;
2. Dottori M., Gurmara C., Leotti G., Ostanello F., Sala V. 2004. Impiego del punteggio polmonare al macello nella valutazione della malattia respiratoria da M. hyopneumoniae sul suino pesante. Atti XXVIII Corso in Patologia Suina, Brescia 2004, pp143-156.
3. Fraile, L., Alegre, A., López-Jiménez, R., Nofrarías, M., Segalés, J. (2010). Risk factors associated with pleuritis and cranio-ventral pulmonary consolidation in slaughter pigs. The Veterinary Journal 184, 326–333;
4. Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., Rugna G., Dottori M. (2013). Update on the monitoring of enzootic pneumonia like lesions in italian slaughtered pigs. 39. Meeting Annuale della Societa' Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS) : 14-15 Marzo 2013 , Piacenza;
5. Madec, F., Kobisch, M. (1982). Bilan lesionnel de poumons de porcs charcutiers a l'abattoir. Journée Recherche Porcine 14, 405–412;
6. Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. (2012). Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. The Veterinary Journal, 193, 234-239;
7. Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Heasebrouk, F., Maes, D. (2011). A cross-sectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. The Veterinary Journal 187, 388–392.
8. Morrison R.B., Pijoan C., Leman A.D. (1986). Association between enzootic pneumonia and performance. Pig News and Information 7, 23-31;
9. Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., Leotti G., Sala V. (2006). Utilizzo del punteggio polmonare (Lung Score) nei suini Italiani: validazione del metodo, valutazione della prevalenza e dei fattori di rischio associati all'infezione da Mycoplasma hyopneumoniae . Large Animal Review, 2, 13-21.
10. Sørensen V. (2006). "Disease of the respiratory system" in: Diseases of Swine, 9th ed., 149-177.

STUDIO SULLA TRASMISSIONE DI MYCOPLASMA HYORHINIS

STUDY ON THE TRASMISSION OF MYCOPLASMA HYORHINIS

USTULIN M.[1], CATANIA S.[2], GOBBO F.[3], FINCATO A.[3], TARGHETTA C.[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

Negli ultimi anni è aumentata l'attenzione verso *M. hyorhinis*,non solo come agente eziologico di polisierosite e artrite ma anche come agente eziologico di patologia respiratoria del suino. Poco è noto al momento sulla sua diffusione negli allevamenti in Italia. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare la presenza, diffusione e trasmissione di *M. hyorhinis* nelle vie respiratorie di suinetti in quattro allevamenti da riproduzione dai primi giorni di vita fino alle prime fasi di ingrasso.

Per *M. hyorhinis* è stata evidenziata una diffusione precoce in tutti i suini nati negli allevamenti inclusi nello studio, anche a fronte di un numero modesto di scrofe positive e una permanenza elevata nell'albero respiratorio fino ai 60 giorni di età con un calo modesto del numero di animali positivi nei due mesi successivi.

ABSTRACT

In recent years attention over *M. hyorhinis* and its role as a pathogen has grown. This bacterium is a recognized agent of polyserositis and arthritis but also seems to have a role in Porcine Respiratory Disease Complex.

At the moment, not much is known about *M. hyorhinis* diffusion in Italian farm. Aim of the present study presence, diffusion and transmission of *M. hyorhinis* in the respiratory trait in piglets from 4 reproduction farm in North-eastern Italy from birth to beginning of fattening.

The results show an early diffusion of the bacteria to upper respiratory trait, even if in most tested farm only a small number of sows resulted positive, high permanence of the *M. hyorhinis* in the respiratory trait until 60 days of age and a modest subsequent decrease of positive animals.

INTRODUZIONE

I Micoplasmi sono piccoli batteri ubiquitari privi di parete cellulare, patogeni e commensali di numerose specie animali.

Due specie di Micoplasma, *M. hyopneumoniae* e *M. hyorhinis*, sono coinvolte nell'eziologia di patologie respiratorie nel suino (Friis e Feenstra, 1994). Nello specifico *M. hyopneumoniae* è causa di polmoniti croniche, mentre *M. hyorhinis* è agente causale di polisierositi, oltre ad essere frequentemente isolato dalle lesioni polmonari di animali con patologia respiratoria in atto (Kobish et al. 1996). Nonostante la crescente attenzione verso *M. hyorhinis* e il suo ruolo come patogeno ancora poco è noto in merito ai pattern di trasmissione, diffusione e permanenza nell'albero respiratorio di questo agente.

Il presente studio ha come scopo quello di valutare la presenza e diffusione di *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae* a livello di cavità nasali di scrofe e suinetti nelle prime settimane di vita e la loro presenza e permanenza a livello d albero bronchiale negli stessi suini nel periodo di svezzamento e magronaggio in quattro allevamenti da riproduzione.

MATERIALI E METODI

I campionamenti relativi al presente studio sono stati effettuati tra aprile 2017 e novembre 2018 presso quattro aziende da riproduzione del Friuli Venezia Giulia.

	Azienda 1	Azienda 2	Azienda 3	Azienda 4
Dimensione (numero di scrofe)	220	250	1200	450
Genetica	Danese, rimonta esterna	Danese, rimonta esterna	Suffolk, rimonata interna	Goland, rimonta esterna
PRRS	Positiva, instabile	Positiva, stabile	Positiva, stabile	Positiva, stabile
Vaccinazioni				
Scrofe	PRRS ogni 3 mesi	PRRS ogni 4 mesi	PRRS ogni 4 mesi	PRRS 60 gg dopo la fecondazione, 6 gg dopo il parto
				Clostridiosi 35 gg prima del parto
		PCV2 ogni 4 mesi		
	Rinite atrofica a fine gravidanza	Influenza ogni 4 mesi	Influenza ogni 4 mesi	Influenza ogni 4 mesi
		Rinite a 90 giorni di gravidanza	Rinite a 90 giorni di gravidanza	Rinite a 90 giorni di gravidanza
	Parvovirus e Mal Rosso allo svezzamento	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto	Parvovirus e Mal rosso 2 settimane dopo il parto
Suinetti	PCV2, *M. hyopneumoniae* 21 giorni	Colibacillosi 18 gg		
		PCV2 30 gg	PCV2 a 35 gg	PCV2 allo svezzamento
		M. hyopneumoniae 80 giorni	*M. hyopneumoniae* 7 gg, richiamo 28 gg	*M. hyopneumoniae* 7-10 gg, richiamo 40 gg
Trattamenti				
Scrofe	Ivermectina prima dell'entrata in sala parto	Levamisole		Ferro 21 gg prima del parto
Suinetti	Alla castrazione: cefalosporina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico	Alla castrazione: amoxicillina	Alla castrazione: amoxicillina + Ac. clavulanico
	Anticoccidico	Anticoccidico	Anticoccidico	Anticoccidico
	Ferro	Ferro	Ferro	Ferro
	Allo svezzamento: amoxicillina	Allo svezzamento: amoxicillina	Allo svezzamento: amoxicillina	
Età di svezzamento	25	26-28	21	26-28
Bande	trisettimanali	trisettimanali	settimanali	settimanali

Tab 1: caratteristiche delle aziende selezionate/selected farms features

Il protocollo di campionamento è stato impostato ipotizzando una prevalenza intra-aziendale del 70%, α=10% e accuratezza=15%.

Da ciascun allevamento sono state identificate tre scrofe al mese per tre mesi successivi, con l'attenzione di selezionare scrofe di diverso ordine di parto in modo da avere un campione rappresentativo di tutte le età; da ciascuna scrofa è stato prelevato 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 nidiate selezionate non sono state sottoposte ad operazione di baliaggio e pareggiamento delle nidiate.

Al trentesimo e sessantesimo giorno di età si è proceduto ad un ulteriore prelievo di tampone nasale a carico dei suinetti precedentemente identificati. A partire dei 90 e 120 giorni di età sono stati effettuati lavaggi bronco alveolari (BAL).

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.

In due delle aziende selezionate sono stati in aggiunta effettuati tamponi vaginali delle scrofe selezionate per valutare ulteriori fonti di diffusione di *M. hyorhinis*.

Tamponi nasali e lavaggi bronco alveolari 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 Territoriale 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

Nel corso dello studio sono stati effettuati 144 tamponi nasali da scrofe, 484 tamponi nasali da suinetti (108 a 2 giorni, 107 a 8 giorni, 103 a 18 giorni, 93 a 30 giorni, 73 a 60 giorni) e 142 BAL (75 a 90 giorni, 67 a 120 giorni).

Come si evince dalla figura 1 la diminuzione del numero di animali inclusi nella ricerca nel periodo è da imputare prevalentemente all'azienda 1, sia per una mortalità elevata nel periodo considerato che per alcune difficoltà nel tracciare gli spostamenti degli animali all'ingrasso. Inoltre, non è stato possibile effettuare uno dei campionamenti a 60 giorni nell'azienda 2.

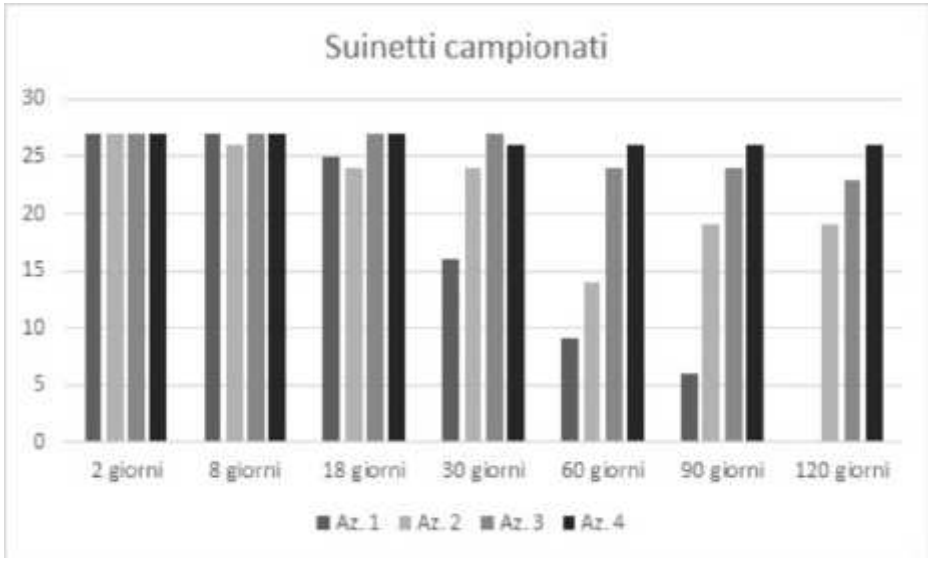


Fig. 1: numero di campioni effettuati sui suinetti /numbers of sampled piglets

Dei 144 tamponi nasali effettuati da scrofe 35 sono risultati positivi. Come si evince dalla distribuzione del numero di positivi per azienda presentati in figura 2, la maggior parte di questi proveniva dall'azienda 4, nella quale 19 su 36 tamponi nasali sono risultati positivi per *M. hyorhinis*. Nell'azienda 1 sono risultati positivi 4 tamponi su 36, nell'azienda 2 sono risultati positivi 7 tamponi su 36 e 5 tamponi s 36 nell'azienda 3. Sono risultate positive a più di un tampone nasale 2 su 9 scrofe dell'azienda 2, 1 su 9 scrofe dell'azienda 3, e 6 su 9 scrofe dell'azienda 4. Nelle aziende 3 e 4 sono stati eseguiti in aggiunta tamponi vaginali nelle scrofe in analisi. Nell'azienda 3 è risultato positivo 1 tampone su 30 eseguiti, nell'azienda 4, 9 tamponi su 24.

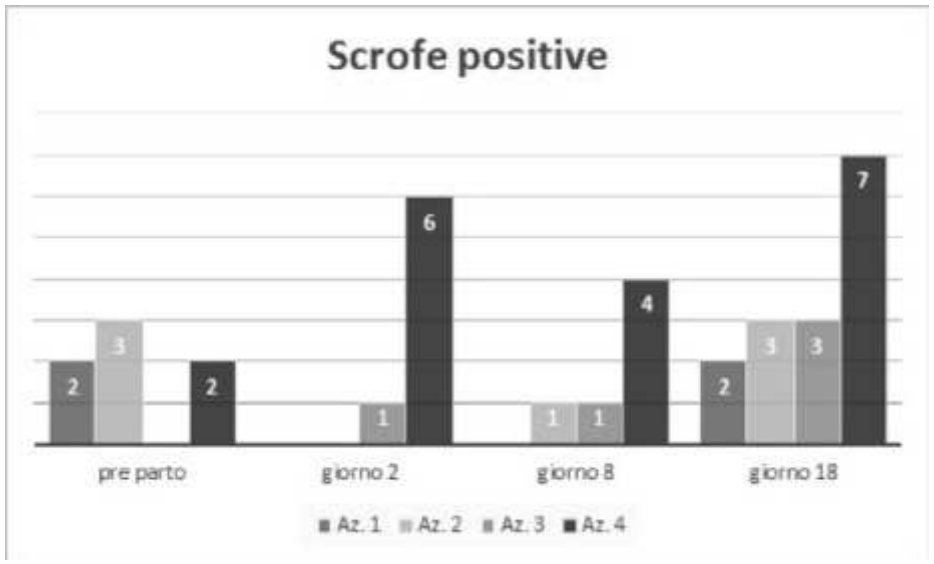


Fig. 2: Numero di tamponi nasali da scrofe positivi/number of positive samples for sows

Per quanto riguarda i campioni prelevati da suinetti nel totale sono risultati positivi per *M. hyorhinis* 283/484 (58,5%) tamponi e 92/142 (64,8%) BAL. Nessun tampone nasale è risultato positivo per *M. hyopneumoniae*, mentre in due allevamenti sono stati identificati campioni di BAL positivi per *M. hyopneumoniae*, per un totale di 60 positivi sugli 89 BAL eseguiti negli allevamenti 2 e 4, di cui 46 positivi sia a *M. hyopneumoniae* che *M. hyorhinis*.

Sono stati identificati nell'azienda 1 1/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 6/27 al giorno 8, 16/25 al giorno 18, 12/16 al giorno 30, 9/9 tamponi al giorno 60, 0/6 BAL positivi al giorno 90. Nell'azienda 2 sono stati identificati 0/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 4/26 al giorno 8, 19/24 al giorno 18, 24/24 al giorno 30, 14/14 al giorno 60, al giorno 90 4/19 campioni di BAL sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, e 13/19 per *M. hyorhinis* e *M. hyopneumoniae*, al giorno 120 1/18 campioni sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 5/18 per *M. hyopneumoniae* e 10/18 per entrambi. Nell'azienda 3 3/27 tamponi sono risultati positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 6/27 al giorno 8, 17/27 al giorno 18, 27/27 al giorno 30, 24/24 al giorno 60, 18/24 BAL al giorno 90, 12/23 al giorno 120. Nell'azienda 4 sono stati identificati 11/27 tamponi positivi per *M. hyorhinis* al giorno 2, 13/27 al giorno 8, 25/27 al giorno 18, 26/26 al giorno 30, 26/26 al giorno 60, al giorno 90 11/26 BAL sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 6/26 per *M. hyopneumoniae* e 5/26 per entrambi, al giorno 120 4/26 campioni sono risultati positivi per *M. hyorhinis*, 3/26 per *M. hyopneumoniae* e 14/26 per entrambi.

La distribuzione per allevamento e per campionamento dei positivi per *M. hyorhinis* è resa graficamente in figura 3, mentre in figura 4 sono rappresentati i positivi per *M. hyopneumoniae*.

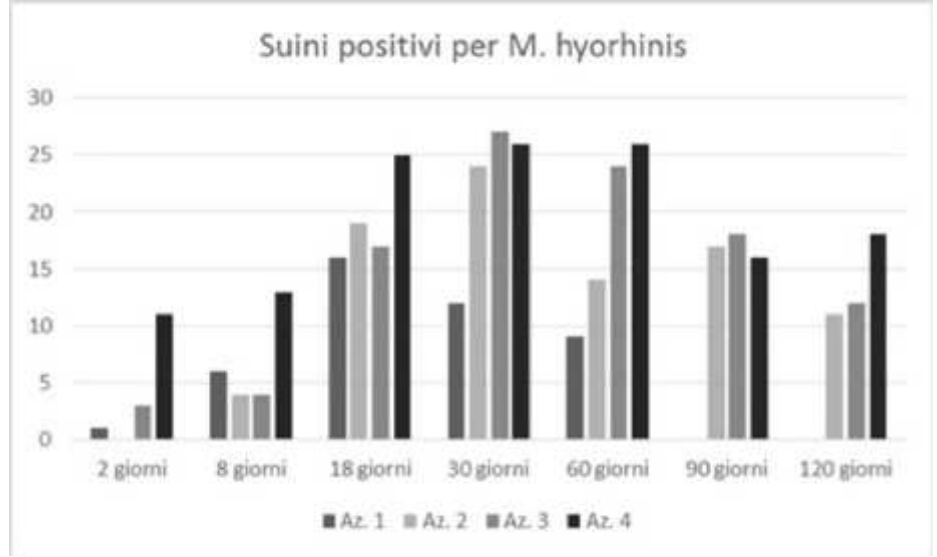


Fig. 3: distribuzione dei campioni positivi per *M. hyorhinis*/distribution of *M. hyorhinis* positive samples

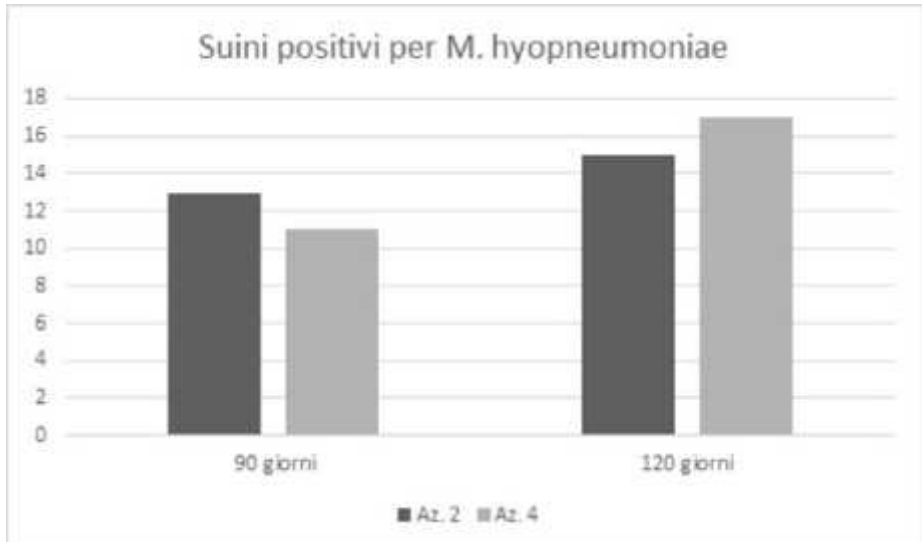


Fig. 4: distribuzione dei campioni positivi per *M. hyopneumoniae*/distribution of *M. hyopneumoniae* positive samples

Nelle figure da 5 a 8 sono invece raccolti i risultati per singola azienda mostrando i campioni positivi per *M. hyorhinis* (HR), per *M. hyopneumoniae* (HP), per entrambi (HR+HP) e i negativi. La figura 9 riassume invece il totale dei risultati ottenuti, ovvero per i tamponi 15/108 (13,9%) positivi *M. hyorhinis* a 2 giorni, 29/107 (27,1%) a 8 giorni, 77/103 (74,8%) a 18 giorni, 89/93 (95,7%) a 30 giorni, 73/73 (100%) a 60 giorni, per i BAL a 90 giorni 33/75 (44%) positivi *M. hyorhinis*, 6/75 (8%) positivi *M. hyopneumoniae*, 18/75 (24%) per entrambi e a 120 giorni 17/67 (25,4%) positivi *M. hyorhinis*, 8/67 (11,9%) positivi *M. hyopneumoniae*, 24/67 (35,8%) per entrambi.

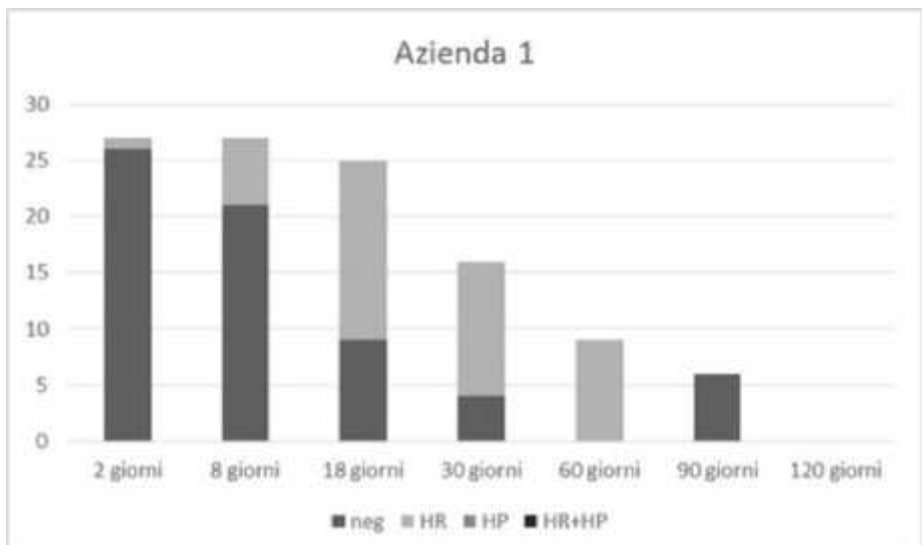


Fig. 5: Risultati ottenuti nell'azienda 1 per i suini/farm 1 results for pigs

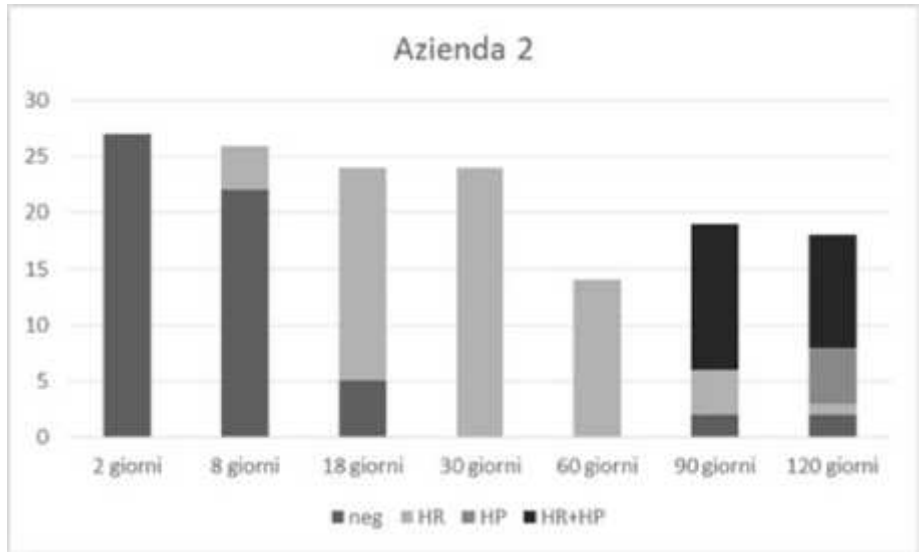


Fig 6: Risultati ottenuti nell'azienda 2 per i suini/ farm 2 results for pigs

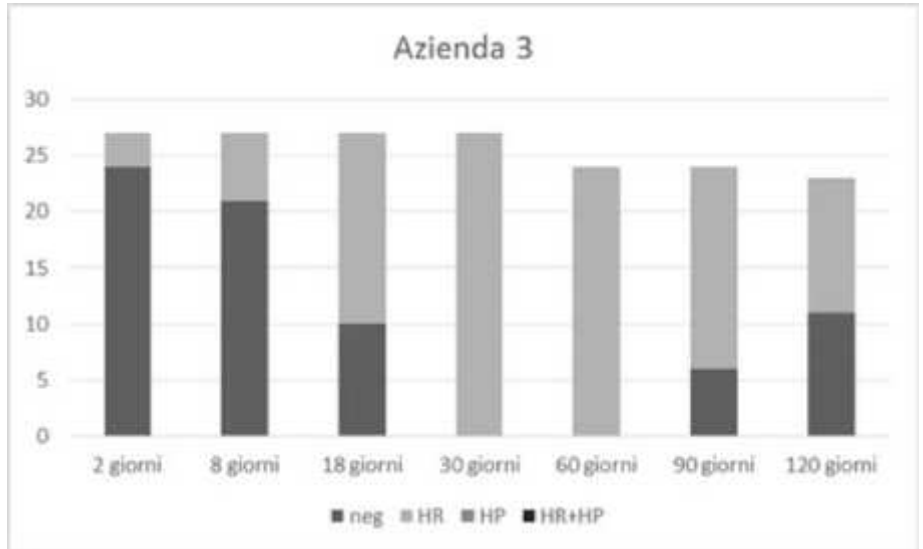


Fig. 7: Risultati ottenuti nell'azienda 3 per i suini/ farm 3 results for pigs

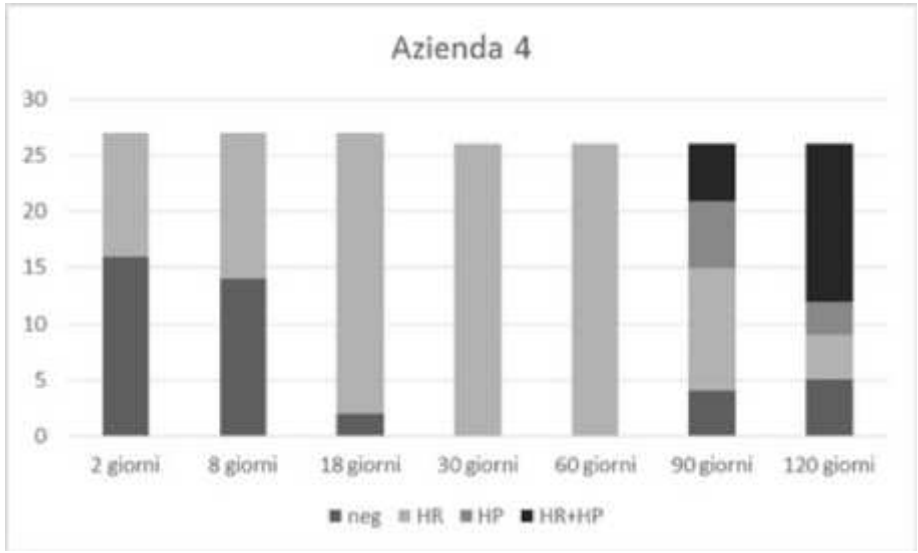


Fig. 8: Risultati ottenuti nell'azienda 4 per i suini/ farm 4 results for pigs

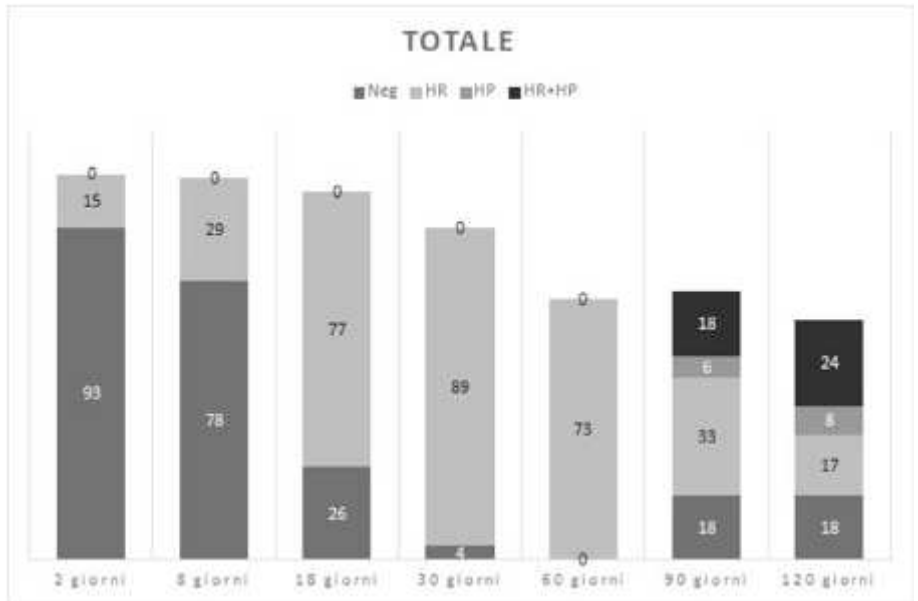


Fig 9: Risultati totali per i suini/overall results for pigs

Nel corso dello studio sono stati segnalati i decessi di 11 suini nell'azienda 1, 6 suine nella azienda 2, 3 suinetti nell'azienda 3.
È stato possibile eseguire esami necroscopici su 5 dei 6 suini deceduti nell'azienda 2 e sui 3 suinetti deceduti nell'azienda 3. Per quanto riguarda l'azienda 2, 3 dei 5 suinetti analizzati sono deceduti per eventi traumatici, presumibilmente schiacciamento. Un soggetto deceduto a 33 giorni di età è invece deceduto in conseguente a una meningite da *Streptococcus suis*. L'ultimo soggetto analizzato, deceduto a 78 giorni di età, presentava una grave polmonite purulenta con presenza di ascessi diffusi nel tessuto polmonare, da cui è stata isolata *Trueperella pyogenes*. Il polmone è risultato positivo in PCR per PRRSV e *M. hyorhinis*.
Dei 3 suinetti relativi all'azienda 3 di cui è stata effettuata la necroscopia, uno, deceduto a 42 giorni di età, presentava grave edema polmonare e deposito di fibrina a livello pleurico; la PCR per PRRSV è risultata positiva mentre le analisi per Micoplasmi negative. Un soggetto deceduto a 57 giorni di età con polmonite interstiziale e meningite fibrinosa, è risultato positivo alle PCR per PRRSV e PCV2 e negativo alla PCR per Micoplasmi. In aggiunta gli esami batteriologici hanno permesso di isolare *Streptococcus suis* dal cervello. Il terzo soggetto, deceduto a 62 giorni di età, presentava polisierosite fibrinosa, broncopolmonite purulenta con presenza di ascessi diffusi nel parenchima polmonare e iperemia dei vasi meningei. Il polmone è risultato positivo in PCR per PRRSV e negativo per Micoplasmi. Presumibilmente, a causa dello stato di conservazione, non ottimale della carcassa l'esame batteriologico non è stato conclusivo.
Nell'azienda 1 si è verificata una mortalità importante in uno dei gruppi ma, a causa di problematiche gestionali, non è stato possibile per l'allevatore conservare le carcasse, pertanto non sono stati eseguiti gli esami necroscopici previsti dal protocollo. Sono state eseguite invece analisi su soggetti coetanei deceduti che hanno evidenziato la circolazione di virus della PRRS tra i 18 e i 30 giorni di età dei suinetti; inoltre è stato isolato *Streptococcus suis* sia a livello polmonare che meningeo, non è stata evidenziata la presenza di *M. hyorhinis* o *hyopneumoniae* dal tessuto polmonare.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti sui tamponi nasali prelevati da scrofe evidenziano in generale la presenza di un numero limitato di scrofe portatrici che emettono M. hyorhinis in maniera intermittente. Il fatto però che nell'azienda 4 si osservi la presenza di un numero nettamente maggiore di animali positivi con maggiore tendenza a mantenersi tali suggerisce che possano esistere fattori (razza, management aziendale, stato sanitario, stagionalità,…) che possano favorire il mantenimento e la diffusione del batterio. A questa evidenza si aggiunge il dato che, oltre allo scolo nasale anche altri fluidi corporei, nello specifico lo scolo vaginale, possano fungere da fonte di infezione, tanto che vi è stata rilevata la corrispondenza tra la presenza di un elevato numero di escretori a livello nasale e vaginale.
Lo studio ha evidenziato che in presenza di un numero maggiore di scrofe escretrici si assiste ad una più rapida diffusione del patogeno tra i suinetti, ma indipendentemente da ciò, a 30 giorni di età la maggior parte dei soggetti testati è risultata positiva a livello di cavità nasali che si mantengono positive anche a due mesi di età.
A 90 giorni, fase in cui il protocollo di studio prevede la a valutazione della presenza di micoplasmi a livello di basse vie respiratorie tramite il prelievo di BAL, viene confermata una elevata frequenza di campioni positivi per *M. hyorhins* a cui sia aggiungono positività per *M. hyopneumoniae.* I campioni di BAL successivi mostrano un aumento dei positivi per *M. hyopneumoniae* a fronte di un modesto calo delle positività per *M. hyorhinis*.
Le necroscopie effettuate hanno permesso di evidenziare la presenza di *M. hyorhinis* a livello polmonare solo in un soggetto di 78 giorni di età con patologia polmonare avanzata.

CONCLUSIONI

I dati raccolti evidenziano una diffusione elevata e precoce a livello intra-aziendale di *M. hyorhinis* in tutte e quattro le aziende valutate indipendentemente dal numero di scrofe rilevate come portatrici. Si identifica inoltre lo scolo vaginale come una ulteriore fonte di diffusione di questo Micoplasma, similmente a *M. bovis*, patogeno del bovino.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 15/15 "Ruolo di Micoplasma 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

1. 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.
2. 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.
3. Friis N. F., Feenstra A.A. Mycoplasma hyorhinis in the etiology of serositis among piglets. Acta Vet Scand. 1994;35(1):93-8.
4. Kobish, M. e Friis N.F. (1996). Swine mycoplasmoses. Revue scientifique et technique 15, 1569–605.
5. 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.
6. 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.

SORVEGLIANZA DELLA TUBERCOLOSI BOVINA NEL CINGHIALE, OSSERVAZIONI EPIDEMIOLOGICHE

BOVINE TUBERCULOSIS SURVEILLANCE IN WILD BOAR, EPIDEMIOLOGICAL ISSUES

GAVAUDAN S.[1], CONQUISTA M.[1], BARCHIESI F.[1], CANONICO C.[1], ANGELONI G.[1], PERUGINI G.[1], ACONITI MANDOLINI N.[1], PAPA P.[1], CROTTI S.[1], MAZZONE P.[1], GASPARI M.[2], BARBONI C.[2], MORANDI F.[3]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche "T.Rosati", Perugia; [2] Azienda Sanitaria Unica Regionale, Regione Marche, Ancona; [3]Parco Nazionale dei Sibillini, Visso (MC)

Parole chiave: cinghiale, tubercolosi bovina, sorveglianza della fauna selvatica
Keywords: wild boar; bovine tuberculosis; wildlife surveillance

RIASSUNTO

Sin dal 1930 è nota la sensibilità del cinghiale alla tubercolosi bovina (BT). In Italia la malattia è stata documentata in Liguria da Dini et al.(1), nelle Marche sono stati documentati casi sin dal 2002 (2). Da allora nel comprensorio appenninico del Monte San Vicino (1450 km^2; 1480 m.s.l., 1480, provincia di Macerata, Marche, IT) un singolo ceppo di *Mycobacterium bovis* è condiviso tra bovino (Razza Marchigiana) e cinghiale in una interfaccia eco-patologica. Nelle ultime stagioni di caccia il numero dei casi è andato aumentando da 35 casi delle stagioni venatorie dal 2002/2003 al 2015/2016 a 77 casi delle stagioni venatorie 2016/2017 e 2017/2018, per complessivi 112 casi. Le relazioni tra infezione tubercolare e popolazione di cinghiale sono state indagate allo scopo di migliorare il controllo della malattia nei selvatici. La popolazione di cinghiale cacciata intesa come numero di casi sottoposti a visita e prelievo per il controllo della trichinosi (Reg.1375/2015), è stata comparata con il numero di casi con lesioni tubercolari (confermati dall'esame batteriologico) rilevati all'esame ispettivo dal Servizio Veterinario Pubblico. Le attività di sorveglianza passiva della BT nel cinghiale sono descritte al fine di fornire i principali indici epidemiologici della malattia nell'area di studio. Questi dati rappresentano una base fondamentale per la pianificazione di nuove azioni di controllo della tubercolosi e per aumentare le conoscenze epidemiologiche della malattia nel cinghiale. I risultati sono discussi per supportare tesi inerenti al ruolo del cinghiale nell'epidemiologia della tubercolosi, nell'ambiente considerato.

ABSTRACT

Since 1930 the susceptibility of wild boar (WB) to Bovine tuberculosis (BT) infection is knew. In Italy, the infection has documented in Liguria by Serraino et al. (1) and in the Marche Region we reported cases since 2002 (2). So far in the Apennine area of Monte San Vicino (1450 km^2; 1480 m.s.l., Macerata province, Marche IT) a single strain of *Mycobacterium bovis* has shared between WB and cattle (Marchigiana Breed) in a wildlife-domestic eco-pathological interface. In the last hunting seasons the number of infected cases rose from no. 35 case of the hunting season 2002/2003 to the season 2015/2016 to the no.77 cases of the seasons 2016/2017 and 2017/2018. The relationship between BT infection and WB population are investigated in order to improve the control of the TB also in wildlife. The hunted WB population, means as no. heads submitted to inspection and sampling for trichinosis detection (Reg. 1375/2015), was compared with the no. of heads with BT lesions (confirmed by bacteriology) detected by the Public Veterinary Inspection Service. The

passive surveillance actions are described for TB in WB and the main epidemiological index are calculated and reported for the studied area. These data represent a fundamental issues in order to plan more and new actions to enhance the control of the disease in the area and to improve the knowledge about the epidemiology of BT in WB. The results are discussed to suppose the role of WB in the epidemiology of the TB in this environment.

INTRODUZIONE

Nel cinghiale l'infezione da *M.bovis* è nota dagli anni '30. In Italia è stata descritta in Liguria negli anni novanta (1) mentre nella Regione Marche, il primo isolamento è avvenuto nel 2002 (2) in un cinghiale proveniente dal comprensorio del Monte San Vicino (1450 km^2; 1480 m.s.l., Regione Marche). Questa area appenninica è compresa tra i Comuni di Matelica, Gagliole e San Severino Marche della provincia di Macerata e quello di Fabriano per la provincia di Ancona. Da allora 112 cinghiali sono risultati colpiti da uno stesso genotipo di *Mycobacterium bovis* (SB0120, VNTR 33533) condiviso con i bovini coinvolti nei diversi focolai della malattia notificati nella stessa area. Nelle ultime 2 stagioni venatorie il numero dei casi di malattia nel cinghiale è andato crescendo, estendendosi anche a territori limitrofi. Al fine di porre le basi per il controllo attivo nella specie selvatica è stata intensificata la sorveglianza sanitaria e organizzata la raccolta dei dati relativi alla popolazione di riferimento, ovvero quella abbattuta in prelievo venatorio.

Nella Regione Marche, dal 1999 i cinghiali abbattuti sono sottoposti a visita ispettiva **(**Decreto del Presidente della Giunta Regionale Marche. n. 114/1999), a seguito della quale viene effettuato il prelievo di diaframma per la ricerca di trichinella (Reg.UE 1375/2015). Più recentemente è stato introdotto l'obbligo di conferire l'intera testa (Decreto Giunta Regionale n.344/2017) al fine di ispezionarne i linfonodi (sottomandibolari e retrofaringei) frequente sede di lesioni granulomatose in questa specie. Nel 2013 la Regione Marche, ha identificato l'area a rischio per la tubercolosi (Decreto del Presidente della Giunta Regionale n.156/2013), impartendo regole più severe di sorveglianza negli animali domestici e selvatici.

MATERIALI e METODI

La visita ispettiva del cinghiale nella Regione Marche viene svolta, presso le case di caccia e nei mattatoi, da Veterinari del Servizio Veterinario Pubblico. Ogni capo è identificato univocamente con un numero progressivo apposto come fascetta inamovibile inserita al momento dell'abbattimento, sotto la responsabilità di un caposquadra riconosciuto. La testa e i visceri, così identificati, sono portati alla visita ispettiva accompagnati dal modulo ufficiale di battuta di caccia. In tale modulo sono riportati la data, la squadra di caccia e la zona di battuta nell'Ambito Territoriale di Caccia (ATC), assieme ai principali rilievi biometrici di ogni capo abbattuto (sesso, classe di età, peso, ecc.). La caratterizzazione biometrica è effettuata da personale formato ed autorizzato dall'ATC, dove la rilevazione dell'età viene effettuata attraverso l'esame della tavola dentaria, raggruppando i soggetti secondo classi di età (≤12 mesi; >12<36; ≥36 mesi). Lo stesso verbale accompagna i campioni di diaframma per la ricerca delle trichine al laboratorio IZS. Tale registrazione permette di risalire per ogni Stagione Venatoria al numero dei capi abbattuti e, attraverso la squadra di caccia (Unità di Gestione), al luogo di abbattimento. Questo è parte di una area più ampia (Distretto di Gestione, DG) e omogenea per il controllo del cinghiale, effettuata dall'ATC provinciale. La condivisione dei dati di gestione con quelli sanitari è l'elemento fondamentale per la stima di prevalenza dell'infezione, dove la popolazione di riferimento è data dal numero di capi sottoposti alla ricerca di trichinella, mentre i capi positivi sono conteggiati a partire dai capi con lesioni sospette, confermate dall'esame colturale. Nei capi sospetti in sede di necroscopia viene effettuato un approfondimento diagnostico relativamente al tipo di

lesione e distretti anatomici interessati. La sede delle lesioni è riferita al distretto linfatico della testa sede di linfoadeniti granulomatose (LG), dell'apparato respiratorio e polmone (AR) o alla generalizzazione delle lesioni (GEN) se ad essere convolti sono più distretti contemporaneamente. I ceppi isolati sono inviati al Centro di Referenza Nazionale per la Tubercolosi (IZS Lombardia ed Emilia Romagna) per la tipizzazione molecolare (spoligotyping e VNTR), al pari di quanto effettuato per i ceppi derivanti dalla diagnosi nel bovino.

RISULTATI

Nel cinghiale, a partire dal 2002 fino alla stagione di caccia 2017/2018, sono stati isolati 112 ceppi di *M.bovis.* La tabella 1 riporta sinteticamente la distribuzione dei casi per stagione venatoria. I ceppi isolati hanno evidenziato un identico profilo genetico comune con i bovini dei focolai della zona (VNTR 33533; spoligotype BCGlike 0120). La ripartizione dei capi infetti per sesso, età e tipo di lesioni è riportata rispettivamente nelle figure 1, 2 e 3. La suddivisione in base al sesso per classe di età considerata dei capi infetti è riportata nella figura 4. Nella figura 5 si riporta la distribuzione delle lesioni, secondo sesso e classe di età dei soggetti colpiti, mentre nelle figure 6 e 7 si riporta in maggior dettaglio la distribuzione delle lesioni, rispettivamente secondo sesso ed età dei capi colpiti.

In tabella 2 sono indicati i capi abbattuti complessivamente per AATTCC (indipendentemente dal Distretto di Gestione) dalla stagione venatoria 2012/2013 alla 2016/2017. In tabella 3 è indicata la prevalenza di infezione per Distretto di Gestione degli anni 2016, 2017 e 2018. Relativamente ai distretti colpiti, le lesioni dell'apparato respiratorio, sempre accompagnate da lesioni dei linfonodi della testa (L.retrofaringei e/o L.mandibolari), sono confermate dall'isolamento di *M.bovis*. Al contrario, la presenza di lesioni della testa, non è indicazione certa di pari lesioni dell'apparato respiratorio.

Tabella 1- Cinghiali positivi per *M.bovis* per stagione di caccia
Table 1- Positive wild boar for M.bovis for hunting season

Stagione venatoria	2002/03	2004/05	2005/06	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	2017/18
n. cinghiali positivi per *M.bovis*	1	3	7	1	1	2	4	10	6	40	37

Tabella 2- Numero di capi abbattuti per ATC *(fonte regione marche, all districts)*
Table 2- no. hunted heads for ATC (source: regione marche, all distrcts)

	2012-2013	2013-2014	2014-2015	2015-2016	2016-2017
ATC AN2	849	781	1216	905	1407
ATC MC1	1267	1174	1593	1187	1609

Tabella 3- Prevalenza per distretto di gestione (DG)
Table 3- Prevalence for management area (DG)

ANNO	ATC	DG	N. CAPI ABBATTUTI/	N.CAPI POSITIVI PER *M.bovis*	P (%)	IC
2016	MC1	A01	185	0	0,0	/
	MC1	B01	696	28	4,0	2,6-5,5
	AN2	A2	344	9	2,6	0,93-4,3
	AN2	B	341	0	0,0	/
2017	MC1	A01	181	1	0,5	0,5-1,6
	MC1	B01	980	16	1,6	0,8-2,4
	AN2	A2	308	7	2,3	0,6-4
	AN2	B	294	2	0,7	0,2-1,6
2018	MC1	A01	219	0*	0,0	/
	MC1	B01	1156	12*	1,0	0,4-1,6
	AN2	A2	264	6*	2,3	0,5-4
	AN2	B	354	0*	0,0	/

**dato relativo agli isolamenti disponibili dei primi mesi dell'anno 2018 (Stagione Venatoria 2017/2018)*
**Isolates available for the early months of the year 2018 (Hunting Season 2017/2018)*

Figura - 1: Sex ratio dei cinghiali positivi (2002-2018)
Image - 1: Sex ratio of positive wild boars (2002-2018)

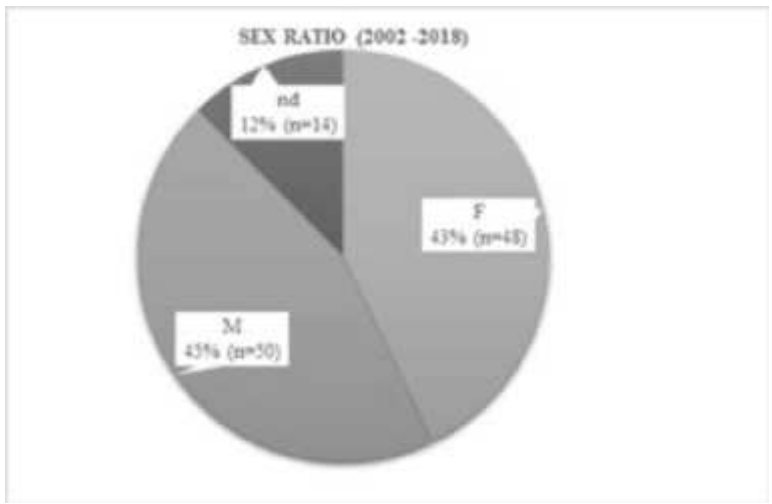


Grafico 2 - Classi di et*à* dei cinghiali positivi (2002-2018)
Image 2- Age groups of positive wild boars (2002-2018)

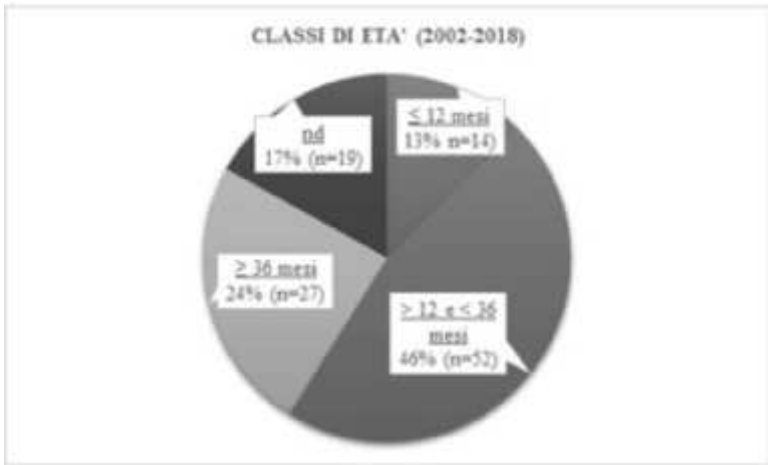
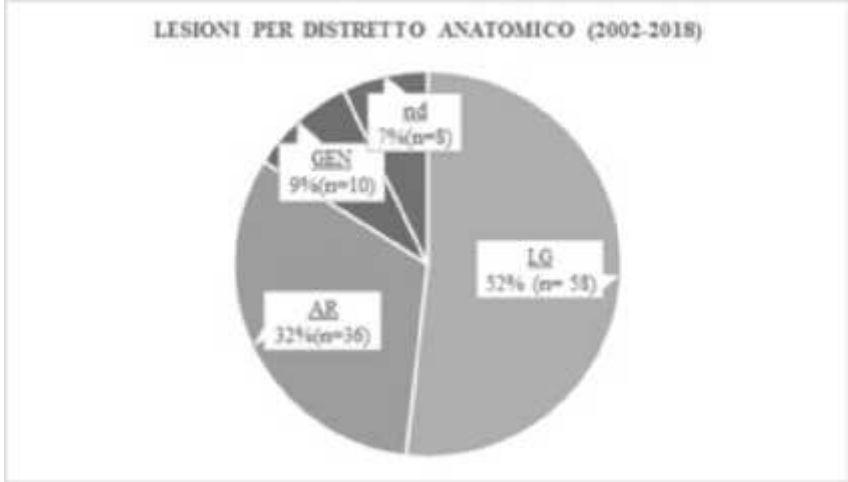
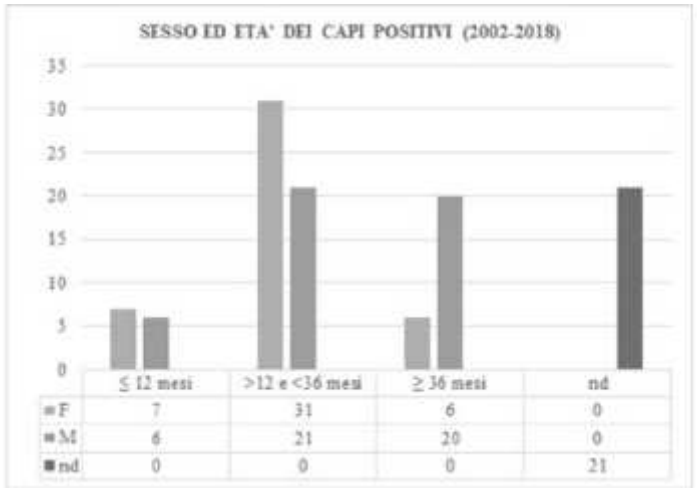


Figura 3 - Distribuzione delle lesioni per distretto anatomico (2002-2018)
Image 3 – Observed lesions by anatomic district (2002-2018)



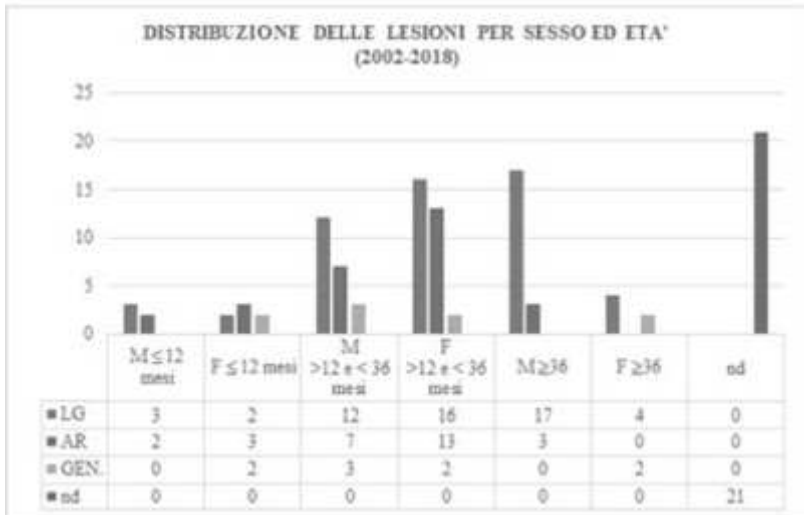
LG:Linfoadenite granulomatosa della testa (head linofadenitis)
AR: lesioni dell'apparato respiratorio (respiratory tract lesions)
GEN: lesioni generalizzate (generalized lesions)
nd: non registrate (not detected)

Figura 4- Capi positivi distribuzione per sesso ed et*à* (2002-2018)
Image 4- Positive wild boar by sex and age (2002-2018)



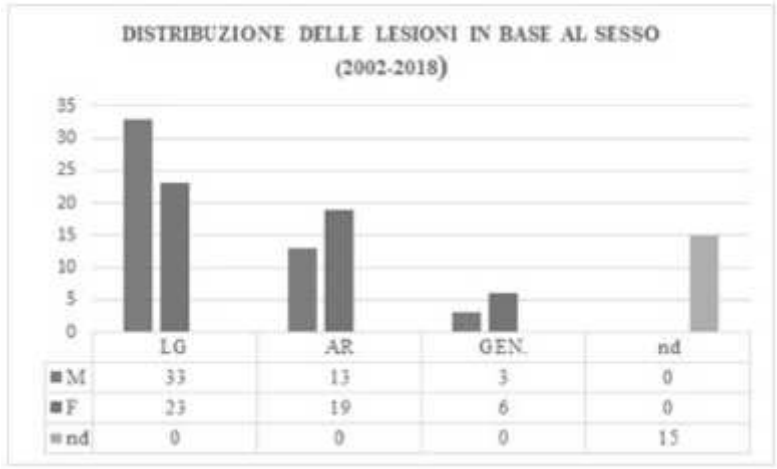
	≤ 12 mesi	>12 e <36 mesi	≥ 36 mesi	nd
F	7	31	6	0
M	6	21	20	0
nd	0	0	0	21

Figura 5 - Distribuzione delle lesioni per sesso ed et*à* (2002-2018)
Image 5 - Observed lesions by sex and age (2002-2018)



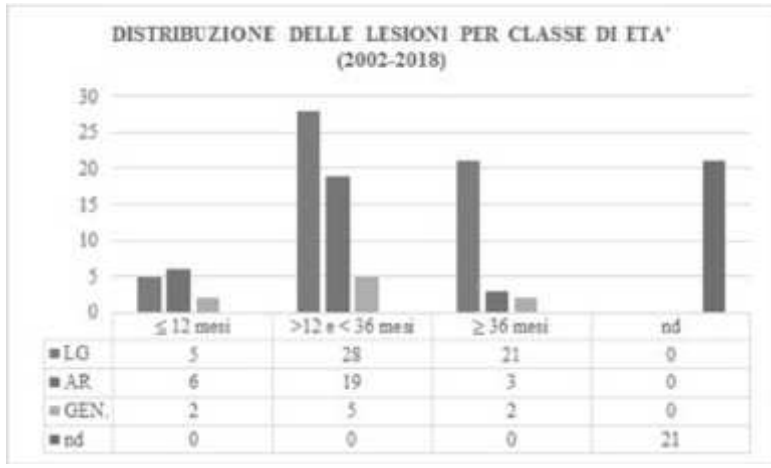
	M ≤12 mesi	F ≤12 mesi	M >12 e <36 mesi	F >12 e <36 mesi	M≥36	F≥36	nd
LG	3	2	12	16	17	4	0
AR	2	3	7	13	3	0	0
GEN.	0	2	3	2	0	2	0
nd	0	0	0	0	0	0	21

Figura 6 - Distribuzione delle lesioni per sesso (2002-2018)
Image 6 - Observed lesions by sex (2002-2018)



	LG	AR	GEN.	nd
M	33	13	3	0
F	23	19	6	0
nd	0	0	0	15

Figura 7- Distribuzione delle lesioni per et*à* (2002-2018)
Image 7- Observed lesions by age (2002-2018)



	≤ 12 mesi	>12 e < 36 mesi	≥ 36 mesi	nd
LG	5	28	21	0
AR	6	19	3	0
GEN.	2	5	2	0
nd	0	0	0	21

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti permettono di valutare la prevalenza per area di caccia (Distretto di Gestione, DG). Tale dato risulta necessario per misurare l'andamento dell'infezione nel tempo e nello spazio. L'organizzazione della raccolta dei dati da noi seguita, permette di effettuare alcune riflessioni in merito alle categorie di sesso ed età dei soggetti colpiti. Se pur tali osservazioni sono preliminari, è da notare che l'infezione tubercolare riconosce una prima sede di lesione nei linfonodi della testa (soprattutto i linfonodi retro faringei e in misura secondaria i linfonodi sottomandibolari), seguita in alcuni casi dall'interessamento dei linfonodi bronchiali e del polmone. Le lesioni bronco-polmonari sono particolarmente rappresentate nelle classi di età centrali (>12<36 mesi), per declinare nella classe di età maggior o uguale ai 36 mesi. Le stesse lesioni broncopolmonari sono maggiormente rappresentate nelle femmine che nei maschi

(dove sono più frequenti le lesioni dei linfonodi della testa. Questa distribuzione, alla luce dell'andamento prevalentemente cronico della patologia, ma anche del comportamento sociale della specie (che vede la presenza di gruppi matriarcali con relativa prole, da cui i maschi si separano per condurre una vita solitaria), permette di supportare alcune ipotesi.
Il comportamento sociale può influire nella trasmissione della malattia, favorita dal contatto diretto e prolungato tra soggetti infetti e sani, supportando le diverse vie d'ingresso: la trasmissione per via alimentare (da latte materno, grufolamento, necrofagia), potrebbe essere affiancata nelle femmine per una maggior esposizione alla via respiratoria per il loro comportamento gregario. La riduzione delle lesioni polmonari rilevate nella classe di età più alta, suggerirebbe al contrario una minor sopravvivenza oltre i tre anni dei soggetti con forme respiratorie, a differenza dei soggetti con linfadenite della testa, che sopravvivrebbero più a lungo.
Non è possibile invece effettuare considerazioni relative alla presenza di lesioni dell'apparato digerente in quanto non osservato in sede ispettiva, né del tipo di lesioni presenti in animali giovanissimi, in quanto questa casistica sfugge completamente al prelievo venatorio.

CONCLUSIONI

L'attività descritta rappresenta schematicamente il sistema di sorveglianza della tubercolosi sviluppato nella Regione Marche e i risultati ottenuti nei diversi anni di studio della problematica. La registrazione dei campioni di cinghiale in laboratorio, recepisce l'anagrafica utilizzata per il prelievo venatorio, producendo dati comuni per la popolazione di cinghiale.
Queste informazioni, associate all'evidenza della circolazione di uno stesso genotipo circolante nel bovino, permettono di effettuare prime ipotesi sulla dinamica dell'infezione di *M.bovis* nel cinghiale e il ruolo della specie nel mantenimento dell'infezione. La misurazione dell'andamento dell'infezione nel tempo e nello spazio è infatti, a nostro avviso, necessaria e preliminare all'introduzione di interventi di riduzione della malattia in questa specie.
La valutazione delle osservazioni effettuate ci permette, in assenza di dati sperimentali, di asserire che l'infezione intra-specifica possa avvenire oltre che per via digerente anche attraverso quella respiratoria, in accordo al comportamento sociale del cinghiale. Per quanto detto è plausibile la trasmissione della patologia dal bovino al cinghiale attraverso la necrofagia su bovini infetti morti al pascolo. Meno chiaro è, a nostro avviso, la possibilità di ritorno dell'infezione dal cinghiale al bovino, stante tuttavia la possibile contaminazione dei pascoli con secreti ed escreti, ma la cui capacità infettante è da dimostrarsi. Senza dubbio è presente un ciclo selvatico dell'infezione, la cui dinamica è stata ipotizzata. Meno chiari sono a nostro avviso i motivi della recrudescenza attuale della malattia, in assenza di sostanziali variazioni della pressione venatoria. Per quanto riguarda invece la diffusione a nuove aree, sembra documentato l'effetto disgregante della battuta di caccia nei gruppi sociali (3). Questi gruppi inoltre, secondo quanto documentato dagli AATTCC, avrebbero aumentato il numero di femmine presenti, in risposta all'aumentata predazione esercitata dal lupo. Tale evidenza potrebbe ulteriormente aumentare i contatti intraspecifici in ambito familiare.

BIBLIOGRAFIA

1. Dini V., Ferroglio E., Serraino A., Mignone W., Sanguinetti V., Bollo E., Rossi L. (2003) - Epidemiologia delle micobatteriosi nel cinghiale in Liguria. J. Mt. Ecol.,7 (Suppl.): 145 -153.
2. Gavaudan S., Bartolini C., De Curtis M., Cagiola M., Duranti A. (2006) – La tubercolosi nell'ecosistema della fauna selvatica e domestica nella regione Marche. Osservatorio Epidemiologico Veterinario Regione Lombardia, 9: 10-13
3. Chenais, E., Ståhl, K., Guberti, V., & Depner, K. (2018). Identification of Wild Boar–Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic. Emerging Infectious Diseases, 24(4), 810-812.

CASI CLINICI

ENTEROPATIA AD EZIOLOGIA MULTIFATTORIALE NELLO SVEZZAMENTO IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO

DI BLASIO A.[1], MARCHIS D.[1], DESIATO R.[1], MILLONE A.[2], CEPPA L.[1], BARBERO R.[1], RU G.[1], MASOERO L.[1], CARUSO C.[2], MESSINA M.[1], DONDO A.[1], ZOPPI S.[1]

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, Torino, Italia, [2] Azienda Sanitaria Locale CN1, Cuneo, Italia

INTRODUZIONE

Nelle prime fasi di vita dei suinetti la diarrea è un sintomo molto comune, e spesso è causa di un innalzamento dei tassi di mortalità e conseguenti gravi perdite economiche nell'immediato (perdita di animali, uso di presidi farmacologici aggiuntivi) e a lungo termine (calo ponderale, allungamento dei tempi di accrescimento)**.** Una diagnosi precoce e tempestiva è molto importante per prevenire e controllare le malattie suine, e si fonda sulla valutazione di età dei soggetti, sede e natura delle lesioni e dovrebbe prevedere sempre una conferma microbiologica, virologica o parassitaria di laboratorio. Tra le cause infettive, nel protocollo di diagnosi differenziale devono essere considerati i principali agenti coinvolti nelle patologie enteriche che si manifestano nelle prime settimane di vita del suinetto: *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC), *Clostridium perfringens*, *Salmonella* sp., Coccidi (*Isospora suis*), Rotavirus e Coronavirus. Nell'ambito delle diarree da Coronavirus, si conoscono due virus differenti, il virus della Gastroenterite Trasmissibile (TGE) e della Diarrea Epidemica Suina (PED). In Italia, la PED è presente dagli anni '90 ed ha avuto un aumento con il contemporaneo declino della TGE, con un andamento ciclico. L'ultima grave epidemia risale al periodo compreso tra il 2014 e il 2017, coinvolgendo 438 aziende del Nord Italia [1]. I suinetti spesso manifestano anche forme subcliniche causate dalla colonizzazione di *Clostridium difficile* probabilmente dovuta ad un'apparente predisposizione fisiologica del loro apparato gastro-enterico [4], sebbene vengano segnalati anche casi clinici più gravi in soggetti neonati [2,4]. Lo scopo del presente lavoro è quello di descrivere l'approccio diagnostico applicato per la gestione di un episodio di enteropatia ad eziologia mista nel sottoscrofa e nello svezzamento in un allevamento piemontese.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico che intendiamo descrivere si è verificato in un'azienda a ciclo chiuso a rimonta esclusivamente interna, che conta circa 2000 capi (230 scrofe, di cui 150 in gestazione; 500 suinetti sottoscrofa). La durata del ciclo di produzione è di 10 mesi, con una media di 10 suinetti per parto/scrofa. Tra i dati sanitari rilevanti, si segnala un tasso di mortalità sottoscrofa e in svezzamento entrambi dell'8%. Il piano vaccinale prevede: SHV1, PRRSV, *Mycoplasma hyopneumoniae*, PCV 2 e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Nel corso del mese di Aprile 2018, si riferivano in azienda un aumento di casi di diarrea a partire dal secondo-terzo giorno di vita, registrando tassi elevati di morbilità e bassa mortalità per la natura autolimitante della sintomatologia che portava comunque ad una riduzione del tasso di conversione e un ridotto incremento ponderale negli svezzati. La scelta aziendale per arginare il problema è stata quella di trattare tutte le nidiate colpite con enrofloxacina per il sospetto avanzato di colibacillosi, senza un evidente miglioramento delle condizioni nelle fasi di svezzamento. Nello specifico, ai suinetti è stata somministrata in un'unica dose, 10mg/Kg p.v. di enrofloxacina. Le frequenze di trattamento nel biennio 2017-2018 su scrofaia e svezzamento sono riportate in tabella 1.

A seguito del fallimento terapeutico, è stato richiesto presso il nostro istituto l'applicazione di un protocollo di diagnostica differenziale per la definizione della causa della sindrome gastroenterica. Si campionavano pool di feci provenienti da 6 gruppi di suinetti sottoscrofa (15-21 gg di età) con sintomatologia clinica di vario grado. I metodi utilizzati per identificare gli agenti patogeni e i risultati di tali analisi sono riportati rispettivamente nelle tabelle 2 e 3.

MOLECOLA	SCROFE	SUINETTI	SVEZZATI	MAGRONI
Amminosidina	12			
Amoxicillina	17	1		
Enrofloxacina			9	
Florfenicolo				30
Apramicina		3		
Tetraciclina				3
Tiamfenicolo				12
Doxiciclina		13		

***Tabella 1**: numero di trattamenti eseguiti nel biennio 2017-2018 suddivisi per categoria produttiva e principio attivo.*

Agente	Tecnica analitica
E. coli enterotossigeni (ETEC)	Esame colturale e PCR per la conferma della presenza di tossine/fimbrie (sta, stb e k88)
Clostridium difficile	Shock alcoolico in rapporto 1:1 delle feci. Esame colturale su Schaedler e Clostridium difficile agar (Becton Dickinson); conferma con triplex PCR end-point (geni gluD e tcdA e tcdB)
Coronavirus	RT-PCR Pan-coronavirus reverse transcription PCR (RT-PCR) [3] e sequenziamento.
Isospora suis	Esame microscopico (arricchimento)
Salmonella sp.	Esame colturale (ISO 6579)
Cryptosporidium parvum	Immunoenzimatico
Rotavirus	Immunoenzimatico

***Tabella 2:** protocollo diagnostico differenziale contemplato e indicazione delle metodiche diagnostiche applicate*

BOX	ETEC	*Clostridium difficile*	Coronavirus	Rotavirus
1	N	P (gluD e tcdA e tcdB)	P	P
2	N	N	P	N
3	N	N	N	N
4	P (sta, stb)	N	N	N
5	N	N	P	N
6	N	N	P	N

***Tabella 3**: esiti degli esami di laboratorio eseguiti con positività e relativa distribuzione su gruppi di animali sintomatici*

Si formulava quindi diagnosi di enteropatia ad eziologia multifattoriale. Dal protocollo diagnostico utilizzato è emersa la circolazione del virus della PED nella maggior parte dei box campionati, virus per il quale, gli autori, ipotizzano un ruolo predisponente l'infezione e la replicazione di *Clostridium difficile*. Nella pratica, infatti, spesso la patologia enterica infettiva è conseguente ad infezioni polimicrobiche e virali simultanee o più di frequente sequenziali. Essendo le gastroenteriti virali causate da virus che distruggono le cellule di assorbimento dei villi intestinali le uniche terapie consigliate risiedono in somministrazione orale o intraperitoneale di elettroliti, associando una terapia antibiotica solo in caso di conferma di infezioni batteriche secondarie. Il riscontro di *E. coli* enterotossigeni (ETEC) in un unico box, fa supporre la risoluzione della diarrea da *E. coli* primariamente sospettata e che il trattamento antibiotico precedentemente applicato sia risultato poco o per nulla efficace a causa della persistente circolazione nel gruppo del virus della PED.
Per tali motivi non si suggeriva nessuna terapia specifica, ma si consigliava un miglioramento della biosicurezza e in particolare il mantenimento di una buona igiene e una gestione, per quanto possibile, di *all-in/all-out***.** Si consigliava l'aumento dello standard igienico utilizzando sistemi di pulizia, detersione e disinfezione con prodotti alcalini per la rimozione di biofilm, il mantenimento dei suinetti in un luogo caldo, asciutto e privo di correnti d'aria, i cambi di abbigliamento e calzature degli operatori e il controllo di accesso a personale esterno e automezzi. Infine, si rendeva necessario rivedere i protocolli terapeutici in modo tale da evitare usi prolungati o insufficienti o posologie non corrette degli antibiotici e, soprattutto, si richiamava l'importanza del rispetto delle indicazioni riportate nel foglietto illustrativo. Relativamente alla PED, essendo l'immunità dei suinetti dipendente da quella delle scrofe, laddove l'immunità di quest'ultime sia bassa e i livelli sanitari inferiori al normale è possibile l'instaurarsi di forme croniche che possono coinvolgere i suini di tutte le età; per tali considerazioni si informava l'azienda riguardo la possibilità di eseguire approfondimenti sierologici con lo scopo di descrivere lo *shedding pattern* del virus della PED in allevamento e lo stato immunitario delle scrofe.

DISCUSSIONE

L'applicazione di un protocollo diagnostico completo resta la base per una corretta diagnosi. In casi come quello descritto, vengono identificati differenti agenti eziologici e diventa cruciale un'attenta analisi delle informazioni diagnostiche e clinico-anamnestiche per la definizione dei ruoli dei diversi patogeni. Si ricorda che il ricorso a terapie antibiotiche in seguito al solo sospetto di malattia, senza una conferma diagnostica, rischia di essere non solo inutile ma anche antieconomico e controproducente. Nell'ambito delle attività di un progetto corrente sono stati raccolti dati riguardo l'uso del farmaco che hanno reso possibile ulteriori considerazioni. In particolare, la disamina dei registri di trattamento in azienda riferiti agli anni 2017 e 2018 ha rilevato un uso di specialità medicinali e di mangimi medicati nelle due categorie considerate (scrofe e suinetti) orientato soprattutto alla terapia di patologie enteriche e respiratori e il trattamento citato con enrofloxacina non corrispondeva a quanto previsto dai protocolli terapeutici, che prevedono una somministrazione di 2,5mg/Kg p.v./die per 3-5 giorni consecutivi. È stato quindi rilevato un uso non corretto dell'antibiotico in presenza di una patologia virale e in assenza di una precisa diagnosi eziologica con una posologia empirica e non aderente alle indicazioni riportate sul foglietto illustrativo. Inoltre, le analisi eseguite in cromatografia liquida (HPLC) nelle feci dei suinetti trattati hanno evidenziato la presenza di valori compresi tra 0,5 e 5,2 mg/kg di enrofloxacina, la cui persistenza (e dei suoi metaboliti) a livello ambientale può essere causa, oltre che della dimostrata pressione selettiva sui microrganismi ambientali, anche di altri effetti negativi ancora poco noti sull'ecosistema [5]. A supporto di tali considerazioni, vi sono le indagini condotte su una selezione di allevamenti suini piemontesi nell'ambito del

progetto sopracitato, in cui è compresa anche l'azienda oggetto del caso clinico descritto, che indicano una discreta presenza di fenomeni di resistenza indotta dagli antimicrobici. In particolare, le resistenze fenotipiche identificate in specie batteriche commensali quali *E. coli* riguardano molte delle molecole utilizzate in suinicoltura per il trattamento delle patologie del sottoscrofa e dello svezzamento: tiamfenicolo, tetraciclina, sulfametossazolo-trimethoprim, tiamulina, gentamicina, ceftiofur ed enrofloxacina con frequenze spesso anche del 100%. Inoltre, si riferisce una frequenza di ceppi di *E. coli* ESBL isolati da feci di circa 12% nelle scrofe, 18% nei suinetti sottoscrofa, 11% svezzati, mentre per i ceppi AmpC positivi, le frequenze sono rispettivamente del 12%, 15% e 17%, a cui si aggiunge anche il settore ingrasso (10%). Si rende indispensabile, così come indicato nelle Linee guida sull'uso prudente degli antibiotici in medicina veterinaria, pubblicate dalla Commissione Europea, un utilizzo mirato degli antimicrobici nei soli casi di reale necessità e in presenza di animali clinicamente malati. La scelta della molecola deve essere indicata dai risultati di un antibiogramma e ristretta alle molecole non utilizzate in medicina umana.

[*Studio finanziato nell'ambito del progetto di Ricerca Corrente del Ministero della Salute Anno 2015 – IZSPLV 13/15 RC*]

BIBLIOGRAFIA

1. Boniotti M.B., Papetti A., Bertasio C., Giacomini E., Lazzaro M., Cerioli M., Faccini S., Bonilauri P., Vezzoli F., Lavazza A., Alborali G.L., (2018) "Porcine Epidemic Diarrhoea Virus in Italy: Disease spread and the role of transportation". Transbound Emerg Dis, 65(6):1935-1942.
2. De Lorenzi G., Pellacini M., Gherpelli Y., Gibelli L., Pangallo G., Bonilauri P., Dottori M., Luppi A., (2018) "Caso clinico: focolaio di clostridiosi da *Clostridium difficile* in suinetti neonati". Atti XLIV Meeting Annuale SIPAS, 15-16 Marxo 2018: 229-33.
3. Lelli D., Papetti A., Sabelli C., Rosti E., Moreno A., Boniotti M.B., (2013) "Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy". Viruses. 5(11):2679-89.
4. Songer J., Uzal F., (2005) "Clostridial enteric infections in pigs". J. Vet. Diagn. Invest., 17, 528-536.
5. Trouchon T., Lefebvre S., (2016) "A Review of Enrofloxacin for Veterinary Use". Open Journal of Veterinary Medicine, 6, 40-58.

FOCOLAIO DI PCV2 SYSTEMIC DISEASE (PCV2-SD) IN SUINETTI PRECEDENTEMENTE VACCINATI CONTRO PCV2

ANDREONI S.[1], INVERNIZZI E.[2], LASAGNA C.[2]

[1]Boehringer Ingelheim Animal Health Italia Spa, [2]Medico Veterinario

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è la descrizione di un caso clinico di *PCV2 systemic disease* (PCV2-SD) in suini in accrescimento, vaccinati per *Circovirus suino di tipo 2* (PCV2), provocato dalla trasmissione verticale di PCV2 da scrofa a suinetto. Il caso clinico è avvenuto nel 2017 in un centro di moltiplicazione scrofette negativo al *Virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina* (PRRSv).

La sintomatologia clinica riscontrata, in animali di 50-60 giorni di vita, induceva ad avanzare un sospetto diagnostico di PCV2-SD. La successiva rilevazione del DNA virale a livello ematico e nei tessuti linfatici e la conferma ottenuta mediante metodica istopatologica, permise di formulare una diagnosi di PCV2-SD. Essendo la sintomatologia presente in animali vaccinati contro PCV2, si cercò di approfondire la causa della comparsa della patologia andando ad indagare il ruolo dei riproduttori su una eventuale trasmissione verticale del patogeno. La rilevazione della presenza del DNA di PCV2 nel siero di suinetti sottoscrofa, non ancora vaccinati, e la presenza del DNA di PCV2 in cordoni ombelicali, prelevati al momento del parto, ha portato alla decisione di implementare una vaccinazione per PCV2 ai riproduttori, portando alla risoluzione del caso clinico.

PCV2 è un piccolo virus a DNA, a singolo filamento, appartenente alla famiglia *Circoviridae,* genere *Circovirus,* considerato uno dei patogeni più importanti nel mondo suinicolo, poiché è responsabile di notevoli perdite economiche a livello mondiale (1).

Identificato alla fine degli anni '90 in Nord America e in Europa, PCV2 è ubiquitario ed è collegato a una grande varietà di forme cliniche collettivamente denominate "*Porcine Circovirus Diseases*" (PCVDs) (2); tra queste la "*PCV2 systemic disease*" (PCV2-SD), precedentemente nota come *Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome* (PMWS), è sicuramente la più diffusa e colpisce suinetti in fase di svezzamento, magronaggio ed ingrasso. Ha una morbilità variabile (dal 4% al 30%) e un'elevata mortalità (dal 4% al 20%). Dal punto di vista clinico è caratterizzata da deperimento e perdita di peso, pallore cutaneo, spesso accompagnati da sintomi respiratori e/o digestivi e occasionalmente ittero. Le lesioni da PCV2 si rilevano principalmente nei tessuti linfoidi, spesso accompagnate da un aumento di volume dei linfonodi sottocutanei. A livello istopatologico le lesioni linfonodali sono caratterizzate da moderata a grave deplezione linfocitaria con infiammazione granulomatosa dei tessuti linfoidi (2). Per una diagnosi definitiva è fondamentale, oltre alla presenza dei sintomi clinici, la rilevazione di moderate o alte quantità di PCV2 nei tessuti danneggiati e l'identificazione immunoistochimica del virus e delle lesioni istopatologiche linfonodali tipiche (3).

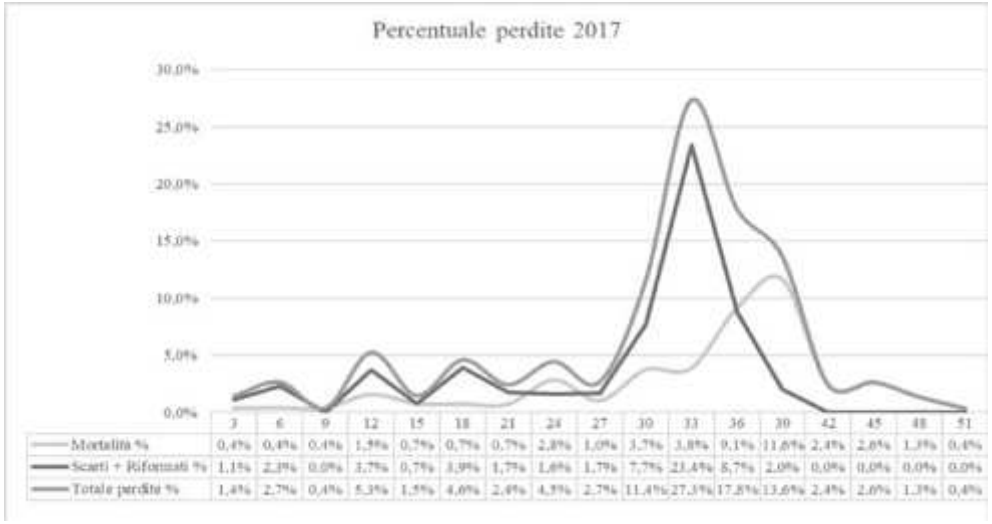
Un'altra forma clinica, meno diffusa, è quella che riguarda la sfera riproduttiva. "*PCV2 reproductive disease*" (PCV2-RD) è il nome utilizzato in letteratura per descrivere tale sindrome. Si può manifestare, a seconda della fase gestazionale coinvolta, con mortalità precoce degli embrioni, ritorno in estro, aborti a termine, aumento del numero di suinetti mummificati, suinetti nati morti e disvitali. È inoltre descritta la trasmissione del virus da scrofa a suinetto tramite l'assunzione di colostro o la trasmissione verticale di PCV2 in utero agli embrioni e/o ai feti; ciò può portare alla nascita di suinetti vitali, viremici ma senza segni clinici. L'infezione dei suinetti in utero è un fattore predisponente per

lo sviluppo di PCV2-SD. È stata descritta infatti una correlazione tra nascita di suinetti viremici e incidenza di PCV2-SD in accrescimento. La conferma di avvenuta infezione in utero può essere ottenuta attraverso il rilevamento del DNA di PCV2 in suinetti appena nati (4).
La vaccinazione dei suinetti per il controllo della PCV2-SD, al giorno d'oggi, è la soluzione adottata a livello mondiale per contrastare PCV2 ed ha portato ad una drastica riduzione dell'espressione clinica della patologia e della circolazione virale in allevamento (1).
La vaccinazione per PCV2 nei riproduttori, invece, è scarsamente utilizzata per controllare la forma clinica di PCV2-RD e la sintomatologia clinica di PCV2-SD. È stato però dimostrato che la vaccinazione dei riproduttori è in grado di ridurre, anche se non eliminare completamente, la trasmissione verticale di PCV2 dalla scrofa al suinetto. La contestuale vaccinazione dei riproduttori e dei suinetti è risultata utile nella diminuzione della viremia e della carica virale nella progenie e nella prevenzione della malattia sistemica da PCV2-SD (4).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico oggetto di questo lavoro si è verificato nell'anno 2017, in un centro di moltiplicazione scrofette, di circa 400 scrofe con produzione a bande tri-settimanali, negativo per PRRSv, *Mycoplasma hyopneumoniae* (M. hyo), Rinite atrofica, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e Malattia di Aujeszky (PRV).
Allo svezzamento (28 giorni di vita), i suinetti maschi e le femmine non adatte alla produzione di scrofette erano trasferiti in un sito 2 esterno all'azienda, mentre le femmine idonee a diventare futuri riproduttori rimanevano in allevamento fino al trasferimento, che poteva avvenire ad età differenti, nelle scrofaie di destinazione.
Il piano vaccinale dei suinetti comprendeva la vaccinazione nei confronti di PCV2 e M.hyo a 21 giorni di vita e PRV come da piano nazionale di controllo della Malattia di Aujeszky.
Prima della comparsa del caso clinico i risultati sanitari di quest'allevamento erano ottimi; la percentuale media annua di animali morti, scarti e animali riformati perché non adatti alla selezione, si attestò al 1,2% nel corso dell'anno 2016.
Nel mese di agosto 2017 si è osservata la comparsa di una sintomatologia enterica e successivamente respiratoria, sul lotto n° 30 (suinetti svezzati nella settimana 30/2017), in animali di circa 50-60 giorni di vita, con un aumento del numero di scarti e animali riformati (con picchi fino al 23,43%) ed un aumento della mortalità (con picchi fino al 11,63%) (Grafico 1). Si osservava inoltre la comparsa di necrosi del padiglione auricolare e aumento di fenomeni di morsicatura della coda.
Gli animali si presentavano con evidente abbattimento del sensorio, segni di dimagramento, pallidi, addome gonfio e respiro addominale.

Grafico 1. Percentuale delle perdite per numero di lotto (morti, scarti e riformati) nell'anno



2017.

Sono stati quindi conferiti presso la sezione di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER) 25 campioni di sangue e 2 carcasse di animali deceduti, per circoscrivere meglio la problematica, e, contestualmente, si è iniziato un trattamento antibiotico mirato alla forma enterica e respiratoria in atto che non ha portato a miglioramenti clinici evidenti.
All'esame autoptico gli animali presentavano dimagramento e disidratazione, linfoadenomegalia generalizzata, versamento sieroso toraco-addominale. Dalle indagini svolte è stato isolato, mediante esame batteriologico, *Escherichia coli* sierogruppo O20 a livello intestinale ed è stato evidenziato tramite metodica PCR Real time il DNA di PCV2 a livello linfonodale con una quantità di 22.600.000 di copie di genoma virale/g ($10^{7,35}$).
Con questi esami ed altri più specifici, qui non riportati, è stata esclusa la presenza di altri patogeni quali PRRS, Influenza di tipo A, M. hyo, PRV e altri agenti batterici.
Una volta ricondotto il problema a una possibile manifestazione di PCV2-SD, per poter confermare la diagnosi, la settimana successiva, altri 3 animali morti con la stessa sintomatologia sono stati conferiti presso l'IZSLER (sezione di Brescia) per eseguire l'esame istopatologico. Contestualmente 5 campioni di linfonodi, prelevati da diversi distretti anatomici, conservati in formalina, sono sati inviati al Laboratorio di Diagnostica e Patologia Veterinaria dell'Università Autonoma di Barcellona in Spagna (SDPV- UAB) per eseguire l'esame istopatologico e immunoistochimico (Tabella 1).

Tabella 1. Esami istopatologici effettuati.

Laboratorio:	Esame eseguito:	Esito:
IZSLER	Esame istologico per inclusione	Linfonodi: edema, deplezione linfocitaria e necrosi multifocali.
SDPV - UAB	Esame istologico per inclusione	Linfonodi: marcata deplezione linfocitaria con marcata infiltrazione istiocitaria.
SDPV - UAB	Immunoperossidasi per PCV2	Linfonodi: positivo con elevata quantità di antigene di PCV2.

Alla luce dei risultati ottenuti si è emessa diagnosi di PCV2-SD.
La sintomatologia intanto si era propagata anche nei lotti successivi 33/2017-36/2017-39/2017.
Essendo gli animali coinvolti vaccinati per PCV2, una volta verificate l'osservazione delle buone pratiche di conservazione del vaccino utilizzato e la sua corretta applicazione, si è pensato di estendere le indagini diagnostiche al comparto riproduttivo, nonostante l'assenza di sintomi clinici evidenti, per poter meglio valutare a livello epidemiologico la situazione creatasi.
Sono stati quindi prelevati 30 campioni ematici da suinetti sottoscrofa (1 suinetto per covata), non ancora vaccinati per PCV2, e dei cordoni ombelicali, raccolti in 2 pool di 4-6 cordoni ognuno, prelevati alla nascita dei suinetti.
Contestualmente, si è deciso di vaccinare nuovamente tutti gli animali presenti in accrescimento per PCV2 e, in attesa degli esiti degli esami effettuati sui cordoni ombelicali e sul siero dei suinetti in sala parto, si è deciso di vaccinare a scopo precauzionale tutte le scrofe presenti, con una vaccinazione a tappeto per PCV2, ed inserire nel programma vaccinale delle scrofe una vaccinazione per PCV2 a 90 giorni di gestazione.
Le risposte degli esami condotti sui cordoni ombelicali hanno evidenziato una quantità di 44.700 ($10^{4,65}$) e 273.000 ($10^{5,44}$) copie di genoma virale/g di PCV2. In 7 suinetti su 30 è stato ritrovato il DNA di PCV2 (valori da $10^{3,30}$ a $10^{9,37}$ copie di genoma virale/ml).
È stato quindi confermato oltre al caso clinico di PCV2-SD nei suini in accrescimento anche la trasmissione verticale di PCV2 da scrofa a suinetto.
Successivamente all'implementazione della vaccinazione nei riproduttori, la sintomatologia clinica si è arrestata drasticamente nel lotto 42/2017 (Grafico 1), ovvero il primo lotto di suinetti nato da madri vaccinate a 90 giorni di gestazione.

DISCUSSIONE

Nel presente caso clinico è stata descritta una manifestazione di PCV2-SD in animali vaccinati contro PCV2. Inizialmente sono state valutate le possibili diagnosi differenziali come ad esempio altre patologie virali e/o batteriche.
La scelta di affiancare alle indagini di biologia molecolare su tessuti e siero le indagini immunoistochimiche su tessuti linfatici, ha avuto un ruolo fondamentale nel raggiungimento della diagnosi di PCV2-SD, come riferito in letteratura (3).
Altro aspetto importante per la risoluzione del caso clinico, utile nella diagnosi di moltissime patologie, è stato l'approccio volto a valutare l'intera catena epidemiologica del patogeno e non solo la fase produttiva colpita.
Infatti, nel caso specifico, la trasmissione verticale di PCV2 da scrofa a suinetto ha portato ad avere una percentuale variabile di suinetti in cui PCV2 era già presente al momento della vaccinazione, andando quindi a rendere meno efficace tale intervento e favorendo una maggiore e precoce circolazione del patogeno in accrescimento.

Il ricorso ad una vaccinazione nei confronti di PCV2 nelle scrofe ha permesso di ridurre la circolazione virale sui riproduttori stessi e sui nuovi nati. Questa pratica è da prendere in considerazione nel quadro di una completa strategia di controllo delle problematiche sanitarie indotte da PCV2.

BIBLIOGRAFIA

1. Segalés J. (2013) Malattie da Circovirus suino (PCVD) In: "Le patologie del maiale". 1a Ed. PVI Milano, pagg 341-360.
2. Segalés J., (2012) Review Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. Virus Research 164, 10-19
3. 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. Veterinary Record. 164, 519-523.
4. Madson D., (2009) Vertical transmission of porcine circovirus type 2 in breeding herds. Graduate Theses and Dissertations. https://lib.dr.iastate.edu/etd/10786

FOCOLAIO DI PLEUROPOLMONITE FIBRINO-NECROTICO-EMORRAGICA IN UN'AZIENDA DA INGRASSO

DE LORENZI G.[1], BARBIERI G.[2], GHERPELLI Y.[1], PANGALLO G.[1], MAGISTRALI CF.[3], GIBELLI L.[1], BONILAURI P.[1], LUPPI A.[1]

[1] Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy.
[2] Progeo, Italy, [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Italy.

INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è descrivere un focolaio di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica causato da *Pasteurella multocida* capsulotipo A *pfh*A+, come evidenziato dalle indagini diagnostiche effettuate, verificatosi in un'azienda da ingrasso (sito 3) del nord Italia.

Le malattie respiratorie sono responsabili di perdite economiche importanti nell'allevamento suino. *P. multocida* tipo A è uno dei batteri responsabili del cosiddetto complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) e viene frequentemente isolata da lesioni polmonari macroscopicamente assimilabili a broncopolmonite catarral-purulenta come agente secondario. Nel suino è opportunista, complicante la polmonite enzootica da *Mycoplasma hyopneumoniae* (Mhyo). L'infezione si osserva più frequentemente negli animali in accrescimento e all'ingrasso. I segni clinici sono variabili e possono comprendere tosse, febbre intermittente, depressione, anoressia, respiro difficoltoso e cianosi nei casi più gravi.

La diffusione dell'infezione avviene principalmente per contatto diretto tra soggetti infetti attraverso le secrezioni nasali e occasionalmente tramite aerosol.

Alcuni ceppi di *P. multocida* tipo A possono comportarsi da patogeni primari e causare forme respiratorie nel suino in assenza di altri agenti patogeni predisponenti. Questi ceppi possono causare pleuropolmonite fibrino-necrotico emorragica e pericardite fibrinosa e possono essere identificati mediante PCR con l'amplificazione del gene *pfh*A (Oliveira Filho et al., 2018).

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico in oggetto ha avuto luogo in una azienda da ingrasso (sito 3) di 1870 suini dislocati in 3 capannoni. I suini venivano allevati con il sistema tutto pieno/tutto vuoto, provenivano da 4 diversi siti 2 e ogni sito 2 riceveva suini da 3 diverse scrofaie. I suini entravano in azienda ad un peso di 31,2 kg. Il piano vaccinale adottato nelle scrofaie di provenienza e per i suini nell'azienda da ingrasso oggetto del focolaio è riportato in Tabella 1.

Tabella 1. Piano vaccinale dei suinetti nei siti 1 di provenienza e dei suini nell'allevamento da ingrasso.

Programma vaccinale suinetti siti 1 di provenienza	Mhyo + PCV2 (a 21 giorni di vita) + Malattia di Aujeszky (PRV)
Programma vaccinale ingrasso	*Actinobacillus pleuropneumoniae* (vaccino a corpo batterico) + PRV (2 interventi) + *Lawsonia intracellularis* + PRRSV

L'allevamento faceva parte di una filiera "antibiotic free" in cui era prevista l'assenza di somministrazione di molecole antibiotiche negli ultimi 4 mesi prima della macellazione. Nell'agosto del 2018, 20 giorni dopo l'arrivo nel sito 3 descritto precedentemente si osservava nei suini la comparsa di forme respiratorie, con tosse grassa, che persistevano fino alla macellazione.
La mortalità media si attestava all'8% nei primi 25 giorni dall'inizio della sintomatologia. Successivamente all'introduzione della terapia si riportava a valori dello 0.5% fino alla macellazione. Successivamente, persistendo la problematica, venne introdotta la terapia antibiotica con l'impiego di Florfenicolo iniettabile (15 mg/kg di peso corporeo) nei soggetti con grave forma clinica e presentanti anoressia, mentre un trattamento metafilattico sempre con l'impiego di Florfenicolo (200 ppm) per 4 giorni per os è stato approntato negli animali a rischio d'infezione. Tre suini morti con sintomi respiratori sono stati quindi conferiti presso l'IZSLER (sezione di Reggio Emilia) e sottoposti ad esame necroscopico. All'apertura della cavità toracica si osservava pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica e pericardite fibrinosa in tutti i soggetti, non si osservavano altre lesioni macroscopiche di rilievo a carico di altri organi e apparati (Figura 1). Le diagnosi differenziali considerate comprendevano pleuropolmonite da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus suis* e da ceppi pleuritici di *P. multocida* (Gottschalk, 2012). In sede necroscopica sono stati prelevati campioni da sottoporre ad indagini diagnostiche (Tabella 2).
P. *multocida* è stata isolata in coltura pura da polmoni ed essudati bronchiali prelevati dai tre suini sottoposti a necroscopia e tramite PCR multiplex è stato possibile individuare la presenza di geni codificanti per il capsulotipo A e l'emoagglutinina filamentosa pfhA (filamentous haemoagglutinin).
All'esame istopatologico dei polmoni si osservava pleuropolmonite fibrinosa caratterizzata da iperemia, edema, alveoli contenenti abbondante detrito cellulare necrotico con "oat cells" ed essudazione fibrino-necrotica sulla sierosa pleurica.
I risultati degli esami di laboratorio effettuati sono riportati in Tabella 2.

Tabella 2. Esami di laboratorio effettuati e risultati.

Esame di laboratorio	Campione	Metodo	Risultati
Esame colturale	Polmone e essudato bronchiale	Semina su Agar globuli addizionato con NAD incubato a 37 °C per 48 ore in microaerofilia	Sviluppo di *Pasteurella multocida*
	Rene e milza	Semina su Agar siero e Gassner agar incubati a 37 °C per 48 ore in aerobiosi	Negativo per agenti patogeni
PCR multiplex *P. multocida* (Townsend et al., 2001)	Ceppo batterico	Rilevazione dei geni *capA*, *capB*, *capD*, *capE* e *capF* e del gene *kmt* specie-specifico *per P. multocida*	Kmt + Capsulotipo A
PCR multiplex *P. multocida* (Atashpaz et al., 2009)	Ceppo batterico	Rilevazione dei geni codificanti per i fattori di virulenza specifici: toxA, tbpA, hgbB e pfhA	pfhA +
PCR PRRSV	Polmone	Rilevazione della presenza dell'RNA del virus della PRRS tramite One-step RT-PCR	Negativa
PCR SIV	Polmone	Rilevazione della presenza di RNA appartenente al virus dell'influenza tipo A mediante reazione di Retrotrascrizione e Real-Time PCR	Negativa
Istologia	Polmone	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, in seguito a fissazione in formalina al 10%	Pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica

La suscettibilità del ceppo di *P. multocida* isolato ad un pannello standard di antibiotici è stata testata mediante il metodo della disco diffusione (Test di Kirby – Bauer).

I risultati del test, in accordo con i parametri interpretativi indicati dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008 e 2013), ha evidenziato la sensibilità del ceppo di *P. multocida* ad Acido Nalidixico (30 µg), Amoxicillina + Acido Clavulanico (20/10µg), Cefalotina (30µg), Ceftiofur (30µg), Enroloxacin (5 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Spectinomicina (100 µg), Tiamulina (30 µg), Tilmicosina (15 µg), Trimethoprim + Sulfonamidi (1.25/23.75 µg).
Il ceppo ha mostrato sensibilità intermedia al Florfenicolo (30 µg) mentre è risultato resistente ad Ampicillina (10 µg) e Tetraciclina (30 µg).
In accordo con i risultati dell'antibiogramma i suini sono stati sottoposti a trattamento antibiotico con Trimethoprim + Sulfonamidi (156 e 780 ppm rispettivamente) nel mangime per 4 giorni (in totale 3 cicli di trattamento, di cui il primo e il secondo a distanza di 7 giorni e il secondo e il terzo a distanza di 14 giorni) e con Tiamulina (400 ppm) nel mangime per 4 giorni. L'intervento terapeutico descritto si è dimostrato risolutivo e dopo questo non sono comparsi nuovi casi clinici riconducibili alla problematica sanitaria descritta.

DISCUSSIONE

Il caso clinico descritto riporta un focolaio di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica con isolamento di *P. multocida* tipo A pfhA+, verificatosi in un'azienda da ingrasso. La diagnosi è stata formulata sulla base dei rilievi anatomopatologici e degli esami di laboratorio, mediante l'isolamento in tutti i suini sottoposti ad indagini diagnostiche di *P. multocida*, la caratterizzazione molecolare dell'isolato e l'esame istopatologico.
P. multocida comprende 5 sierotipi capsulari (A, B, D, E, ed F) e 16 sierotipi distinti sulla base dei lipopolisaccaridi di parete. I capsulotipi A e D sono quelli più comuni nel suino e il capsulo tipo A è quello più frequentemente isolato in corso di polmonite.
Generalmente i ceppi dotati di capsula sono più virulenti rispetto ai ceppi acapsulati. La capsula batterica permette infatti di resistere alla fagocitosi e interferisce con il richiamo dei granulociti neutrofili. La patogenicità di *P. multocida* è associata anche ad altri fattori di virulenza che costituiscono importanti *marker* di patogenicità. Tra questi fattori l'emoagglutinina filamentosa (filamentous haemoagglutinin o pfhA) è codificata da un gene generalmente associato ai capsulotipi A, B, E ed F ed è presente nei ceppi ad alta patogenicità di *P. multocida* (Oliveira Filho et al., 2018).
Sebbene la pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica riconosca come causa eziologica più importante *l'Actinobacillus pleuropneumoniae*, la diagnosi differenziale dev'essere posta con possibili casi dovuti ad *Actinobacillus suis* ed i cosiddetti ceppi pleuritici di *Pasteurella multocida* che raramente possono essere responsabili di queste lesioni anatomo-patologiche nel suino (Gottschalk et al., 2012). Casi di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica in allevamenti da ingrasso causati da ceppi di *P. multocida* tipo A con lesioni cosiddette "*A. pleuropneumoniae*-like" sono state descritte da altri Autori (Olivera Filho et al., 2015).
Oliveira Filho et al. (2015) hanno descritto una sperimentazione in cui è stata somministrata una soluzione a diversa concentrazione di *P. multocida* tipo A ceppo 11246 per via intranasale a 4 gruppi di suini.
Gli Autori riportano che i suini cui era stata somministrata la soluzione con uguale numero di u.f.c di *P. multocida* tipo A presentavano lesioni differenti sia macroscopicamente che all'esame istopatologico. Gli Autori hanno ipotizzato che queste differenze potessero essere dovute alla diversa suscettibilità dei singoli animali all'infezione.
Nel caso clinico in oggetto lo sviluppo di pleuropolmonite in corso di infezione da *P. multocida* tipo A potrebbe dipendere sia dalla risposta individuale dei suini all'infezione, sia da fattori legati alla diversità genetica dei ceppi di *P. multocida* circolanti in allevamento.

L'elevata patogenicità del ceppo isolato di *P. multocida* tipo A e lo sviluppo di lesioni *Actinobacillus pleuropneumoniae*-like, infatti, potrebbe indicare la presenza di possibili differenze genetiche e di virulenza tra i ceppi circolanti.
Il trattamento antibiotico adottato nel caso clinico in oggetto si è dimostrato efficace, tuttavia in alcuni casi non ha portato ad una completa guarigione clinica degli animali. Questo potrebbe essere imputabile alla incapacità del farmaco antibiotico di raggiungere concentrazioni terapeutiche nel parenchima polmonare gravemente compromesso (Register KB et al., 2012).
Le più alte prevalenze di polmonite da *P. multocida* si osservano negli allevamenti ad elevata densità con scadente qualità dell'aria. La riduzione della diffusione di *P. multocida* in allevamento dipende principalmente da fattori manageriali quali tutto pieno/tutto vuoto, limitare l'introduzione di suini da altre aziende e determinare lo stato sanitario dell'azienda di provenienza, ridurre al minimo i rimescolamenti, e la densità degli animali. Storicamente *P. mutocida* è considerata un patogeno opportunista secondario nel complesso della malattia respiratoria del suino. Studi recenti tuttavia hanno confermato il ruolo di patogeno primario di ceppi di *P. multocida* ad alta virulenza in grado determinare lesioni *A. pleuropenumoiae*-like (Olivera Filho et al., 2015)
A causa dell'impossibilità di arrivare a conclusioni eziologiche su base clinica o partendo dalle lesioni anatomo-patologiche, è importante svolgere esami di laboratorio di conferma sia a fini diagnostici, sia per la determinazione dei fattori di virulenza dei ceppi di *P. multocida* isolati da casi di pleuropolmonite fibrino-necrotico-emorragica.

Fig. 1. Polmoni di uno dei suini morti con sintomi respiratori. Pleuropolmonite fibrino-necrotico emorragica

BIBLIOGRAFIA
1. Atashpaz S, Shayegh J, Hejazi MS. **(**2009) "Rapid virulence typing of *Pasteurella multocida* by multiplex PCR". Res Vet Sci. 87(3):355-7.
2. 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.
3. CLSI VET01-A4: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard- Fourth Edition July 2013.
4. Gottschalk M. (2012) "Actinobacillosis" in Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schartz KJ, Stevenson W. "Disease of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 653-669.
5. Oliveira Filho JX, Morés MAZ , Rebelatto R, Agnol AMD, Plieski CLA, Klein CS, Barcellos D, Morés N. (2015) "*Pasteurella multocida* type A as the primary agent of pneumonia and septicaemia in pigs". Pesq. Vet. Bras. 35(8):716-72.
6. Oliveira Filho JX, Morés MAZ, Rebellato R, Kich JD, Cantão ME, Klein CS, Guedes RMC, Coldebella A, Barcellos DESN, Morés N. **(**2018) "Pathogenic variability among *Pasteurella multocida* type A isolates from Brazilian pig farms". BMC Vet Res. 22;14(1):244.
7. Register KB, Brockmeier SL, de Jong MF, Pijoan C. "Pasteurellosis" in Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schartz KJ, Stevenson W. "Disease of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 798-810.
8. Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. (2001) "Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system". J Clin Microbiol. 39(3):924-9.

LA VARABILE NUMERO SETTE: IL PESO ALLA NASCITA

PALADIN G.B., NODARI M.

Medico Veterinario Agricola San Luigi; Allevatore

INTRODUZIONE

La variabile numero sette misura e analizza il peso dei suinetti alla nascita. Sono stati pesati 2.848 suinetti partoriti da 214 scrofe espressione di una mandria di 620 fattrici. Sono stati suddivisi in quattro classi di appartenenza. La prima riconosce i "sottopeso" (meno di 900 grammi) ed è rappresentata da 416 suinetti, il 14,6 %, con un peso medio di 670 grammi.
Pur appartenendo alla stessa classe i sottopeso non riconoscono le stesse cause e non hanno gli stessi destini. Sono espressione di tre tipologie di nidiate, da "sovraffollamento uterino" (23 parti con 330 suinetti), da cause "meccaniche" (108 suinetti di 79 parti) e da "sofferenze fatali" (308 suinetti di 64 parti) (nidiate problema). I primi reagiscono positivamente ai baliaggi, alle cure nei giorni della colostratura e colonizzazione batterica. Gli altri reagiscono negativamente al baliaggio, si colostrano e colonizzano male sono maggiormente esposti alla morte per raffreddamento, enteriti e schiacciamento.
La capacità di crescita in lattazione è collegata al peso di nascita e alle cause che li ha generati. Per i normopeso il fattore di crescita nei 21 giorni di lattazione è stato di circa sei volte il peso di nascita. I sottopeso che sopravvivono, raramente raggiungono il fattore sei. È necessario pertanto una attenta riflessione sulla convenienza.
L'imprevedibilità del peso alla nascita, non periziabile in gestazione, richiede la conoscenza di altre variabili che valutino la condizione sanitaria, le profilassi, il microclima e le dinamiche sociali della scrofa durante tutta la gestazione anche se ogni periodo gestazionale ha ricadute differenti sul feto.

Contesto del caso in analisi

La scrofa è un mammifero "pluri-fetale". I suinetti al parto sono fratelli contemporanei di madre o pieni se in monospermia.
L'utero è un organo elastico le cui corna possono estendersi fino a 2,5 metri, ogni feto occupa circa 30 centimetri. L'estensione si associa all'angiogenesi della arteria uterina e della ovarica a garanzia del nutrimento, della crescita e quindi del peso dei feti. Lo scambio madre/feto può essere "disturbato" con ripercussioni sullo sviluppo di alcuni feti o di tutta la nidiata.
La variabile numero sette è una variabile qualitativa perché misura, con il peso alla nascita, il ritmo di crescita dei feti. Il peso di nascita è importante per la sua stretta e diretta relazione con il ritmo di crescita in lattazione.
Alla conta degli "svezzati scrofa anno" è sempre più importante associare il peso dei suinetti allo svezzamento.

DESCRIZIONE DEL CASO

Caratteristiche del campione.

Sono stati pesati 2.848 suinetti nati vivi da 214 parti (espressione di altrettante scrofe) in un intervallo temporale di 115 giorni dal 7-9-18 al 31-12-18. (Tabella 2)
I parti totali della mandria nel 2018 sono stati 1.309. Il campione esprimendo il 16,12 % dei parti è rappresentativo.
Non tutte le nidiate dell'intervallo sono state pesate ma tutte quelle possibili. La demografia delle scrofe è bene rappresentata.

Lettura degli elaborati
Il peso dei 2.848 suinetti è compreso nell'intervallo tra il valore minimo di 300 grammi e il massimo di 2.600 grammi. Organizzati in classi omogenee e progressive con intervalli di 100 grammi, disegnano una gaussiana con base ampia il cui apice di 1.200 grammi (che è anche media) è rappresentato 361 suinetti. (Grafico 1)
La demografia del campione è rappresentativa della mandria. Sono stati pesati suinetti di scrofe nell'intervallo tra il dodicesimo parto (2014) e il primo parto (2018). (Grafico 3)
Il peso dei suinetti è stato organizzato in 4 classi (Grafico 2) in modo da evidenziare quelli sottopeso. La discriminante di 900 grammi, che definisce la prima classe e identifica i sottopeso, è una scelta di allevamento. (Tabella 1)
I maialini in classe uno sono "suinetti problema".
Alcuni sottopeso, targhettati, e ri-pesati alla morte (tendenzialmente entro 3 gg) hanno registrato lo stesso peso o uno leggermente inferiore con stomaco vuoto, specialmente quelli in baliaggio, altri però hanno registrato un aumento, anche se contenuto, del peso con stomaco pieno.
Al contrario le classi più pesanti hanno dimostrato progressivamente al peso una maggiore autonomia e competizione e una minor incidenza per mortalità nei primi tre giorni.
Il peso medio della nidiata è di 16,42 Kg. (al netto dei nati morti e mummificati) (Tabella 2)
È un dato interessante ma poco significativo perché maschera quelli sottopeso.
Il peso medio, al netto dei sottopeso, risulta molto interessante e da ricercare, (Tabella 2) informa sulle caratteristiche e sulla prognosi di crescita del resto della nidiata. Pesi medi prossimi al peso soglia sono espressione di una sofferenza fetale irreversibile.
Il peso della nidiata è stato agganciato anche alla demografia della scrofa (Grafico 3). Non si riscontrano correlazione tra le due variabili. Il peso massimo accomuna tutte le demografie e si assesta sui 24,5 Kg quasi a definire un limite superiore.
I parti senza sottopeso sono 71 e rappresentano il 33 % dei totali. I parti con un massimo di due sottopeso (ingorgo fetale) sono 79 il 37 % degli effettivi con 108 sottopeso, mentre i parti con presenza di più sottopeso da 3 a 8 (nidiate problema) sono 64 il 30 % degli effettivi con 308 sottopeso. La Tavola 2 e il Grafico 4 correlando più variabili mettendo in evidenza situazioni anomale che altrimenti non emergerebbero.

DISCUSSIONE
Possibili cause dei "sottopeso"
Dal lavoro emerge come uguali pesi di partenza riconoscono, al termine della gestazione, valori anche molto differenti non giustificabili dal grado di parentela.
La crescita fetale è sensibile alla dimensione della nidiata ma anche ad anomalie nell'interscambio madre feto per brevi periodi o durante tutta la gestazione con ripercussioni sulla crescita di tutta la nidiata o di alcuni feti identificati come "sottopeso".
Si riconoscono tre principali cause.
Ritardi di crescita con **minor peso da sovraffollamento**. Un rapporto inverso lega la dimensione della nidiata al peso dei suinetti. L'interscambio madre e feto non presenta particolari anomalie ma solo una eccessiva richiesta fetale.
I **sottopeso meccanici** per "ingorgo fetale" sono causati da un rapporto anomalo tra feti. Il tipo di placenta "sindesmocoriale" richiede che tutta la superfice placentare sia a contatto attivo con l'endometrio affinché si abbia un interscambio funzionale feto madre.
L'ingorgo fetale è sempre più chiamato in causa per giustificare i mummificati.
La **sofferenza fetale** che interessa in modo indifferente e contemporaneo tutti i suinetti della nidiata tanto da renderla "problema" ha cause multifattoriali. Vengono chiamati in causa disturbi temporanei o permanenti primari o secondari al flusso nell'interscambio materno placentare. Quando la sofferenza si ha nell'ultimo terzo della gestazione si è soliti notare

suinetti "grandi ma magri" (in evidenza la colonna vertebrale) con una base ossea non "riempita" da un adeguato sviluppo della massa muscolare.
Rimangono "aperte" queste due domande:

- Il Peso Della Nidiata E Dei Singoli Suinetti Sono Prevedibili Al Momento Del Parto?
- Il Peso della nidiata e dei singoli suinetti sono recidivi?

Il peso e le prestazioni
Il peso alla nascita condiziona la capacità di crescita in lattazione e per estensione all'ingrasso.
La crescita in lattazione è stata quantificata dal numero di volte che viene moltiplicato il peso iniziale.
Abbiamo potuto vedere come un suinetto nei 21 giorni di lattazione incrementi circa 6 (5,78) volte il suo peso di nascita. Il divario tra un sottopeso e un normo peso è significativo, ambedue sono cresciuti nel rispetto della loro potenzialità. La crescita fetale e quella in lattazione disegnano due rette divergenti che richiedono una attenta valutazione di convenienza. (Grafico 5)
Per i suinetti baliati il ritmo di crescita è stato discordante, per alcuni fortemente disturbato (quelli con sofferenza fetale) mentre altri non ne hanno risentito (ritardo di crescita per sovraffollamento)
Abbiamo potuto costatare come il peso guadagnato nei 3 giorni di colostratura e colonizzazione batterica sembra predittivo del peso a fine lattazione. I migliori soggetti e le migliori covate, hanno incrementato il peso del 40, 50% in condizioni paritarie tra ghiandole mammarie e suinetti e senza balie.
Spesso la gestione protettiva richiesta dai sottopeso vede in qualche modo "trascurare" quelli più pesanti. Compromettere i normo peso per tutelare i sottopeso è da stolti. Due risultati negativi su tre.
Bisogna avere il coraggio, definito il peso soglia del proprio allevamento, di non investire risorse e tempo sugli scartini per concentrarsi sui rimanenti qualunque sia il numero dei nati vivi. La scrofa insegna proprio questo: tutelare il migliore.

Considerazioni
Il peso di nascita può essere "tutelato" e reso meno imprevedibile rispettando la gestazione della scrofa. Malattia delle gestanti, i farmaci per curarle, le prevenzioni vaccinali, il microclima e l'ambito sociale influenzano lo sviluppo dei feti. La condizione di nutrizione è importante ma non strategica tanto che un aumento del regime alimentare nell'ultima fase di gestazione per avere suinetti più pesanti si è dimostrato non solo ininfluente ma negativo per la scrofa.
La variabile numero sette deve diventare una pratica rutinaria possibilmente associata a nuove variabili che analizzino il periodo di gestazione in modo da prevedere o da giustificare pesi non conformi.

BIBLIOGRAFIA
1. Influence of maternal feed allowance mid-gestation on progeny muscle development and sow performance over three consecutive cycles. *Alba ceribuelo garcia*
2. Influence of pig embryos on uterine growth. *M. C. Wu, w. J. Shin and p. J. Dziuk*
3. Relationships between uterine length and number of fetuses and prenatal mortality in pigs. *M. C. Wu, m. D. Hentzel t and p. J. Dziuk*

Grafico 1: Peso dei suinetti alla nascita ordinato per valore.

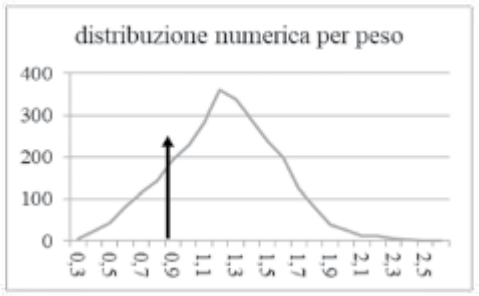


Grafico 2: distribuzione dei pesi in 4 classi.

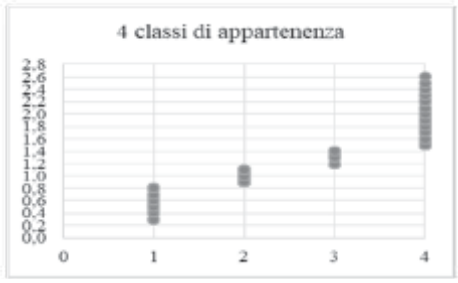


Grafico 3: peso nidiata vs demografia.

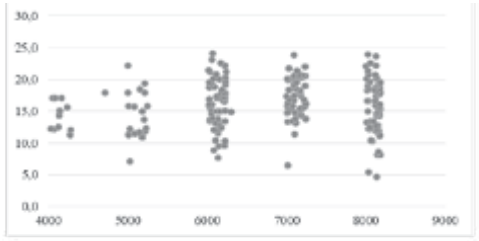


Grafico 4: nati vivi peso nidiata e medio

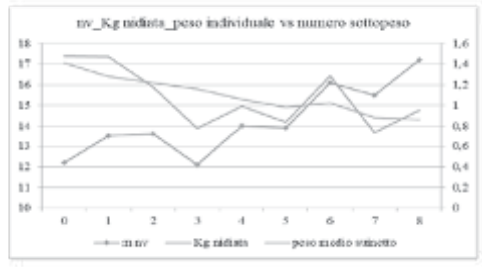


Tabella 1: le quattro classi

ampiezza delle classi, incidenza e peso medio					
classe	da	a	n°	%	pm
1		< 0,9	416	14,6	0,67
2	0,90	1,20	706	24,8	1,29
3	1,20	1,50	988	34,7	1,29
4		> 1,5	738	25,9	1,66

Grafico 5: crescita fetale vs lattazione

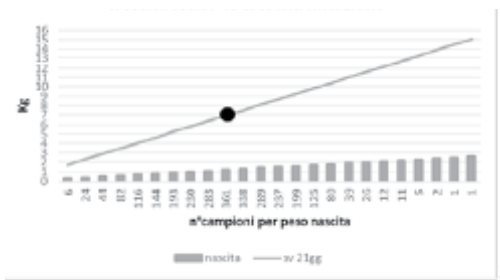


Tabella 2: analisi nidiate per incidenza sottopeso

sottopeso per nidiata	numero parti	% su parti	numero sottopeso	numero normopeso	media nati vivi	Kg media peso vivo	n° medio normopeso	Kg media normopeso	Kg nidiata
0	71	33,2	0	866	12,2	1,41	12,2	1,41	17,37
1	50	23,4	50	627	13,5	1,28	12,5	1,32	17,35
2	29	13,6	58	337	13,6	1,22	11,6	1,23	15,88
3	12	5,6	36	109	12,1	1,16	9,1	1,30	13,88
4	19	8,9	76	190	14,0	1,06	10	1,21	14,95
5	16	7,5	80	142	13,9	0,98	8,9	1,17	14,17
6	8	3,7	48	81	16,1	1,02	10,1	1,23	16,43
7	4	1,9	28	34	15,5	0,88	8,5	1,06	13,67
8	5	2,3	40	46	17,2	0,86	9,2	1,03	14,76
	214	**100**	**416**	**2.432**	**13,3**	**1,21**	**11,4**	**1,29**	**16,3**

MORSICATURA DELLA CODA IN SUINI ALLO SVEZZAMENTO

FUSCO L.

Libero professionista, Reggio Emilia

INTRODUZIONE

Negli allevamenti intensivi di suini è molto comune riscontrare fenomeni di cannibalismo; essi sono dovuti, in genere, ad una pianificazione poco accorta degli elementi fondamentali delle strutture: ambienti non idonei, sistemi di alimentazione inadeguati, impianti di climatizzazione mal gestiti. Ed è proprio quest'ultimo aspetto ad essere alla base del caso clinico di seguito presentato; gli episodi di cannibalismo erano la conseguenza di atteggiamenti di disadattamento che minavano il benessere degli animali e causavano perdite economiche all'azienda.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico si è verificato in un allevamento di suini in Croazia. L'azienda è un ciclo chiuso di circa 1100 scrofe di genetica danese ed è dotata di strutture idonee e specifiche con elevate caratteristiche tecniche. La gestione è in banda settimanale, con svezzamento a 28 giorni. E' presente un buon livello di coibentazione, la ventilazione è forzata in tutti i reparti e sono presenti centraline molto sofisticate che controllano i parametri ambientali.
L'allevatore riferisce di atti di cannibalismo delle code in svezzamento quando i suinetti raggiungono un peso tra i 12 e 15 kg; le perdite, tra gli scarti e i morti, si aggirano intorno al 20 %. Contrariamente a quello che studi precedenti ci inducono a pensare, la sintomatologia si evidenzia soprattutto nel periodo estivo.
Lo svezzamento e tutti gli altri reparti seguono la tecnica del tutto vuoto-tutto pieno; gli animali vengono stabulati in box che hanno nelle zone di riposo una pavimentazione piena in cemento opportunamente riscaldata e, in quelle destinate alle deiezioni, un grigliato in plastica. Per l'abbeverata si impiegano abbeveratoi a tazzetta e per l'alimento, somministrato a secco, è prevista una mangiatoia del tipo mangia e bevi *ad libitum*. I suini, una volta raggiunti i 25 kg, vengono spostati nel magronaggio-ingrasso dove il problema si perpetua. La densità nei box svezzamento è sempre rispettata e la coda viene lasciata intatta. I trattamenti sono a base di lincomicina per i primi 7 giorni post-svezzamento e di doxiciclina e tiamulina a partire dalla terza settimana. I suinetti non vengono vaccinati.
La prima visita è avvenuta nel mese di luglio 2018 e all'esame obiettivo particolare non si sono rilevate turbe enteriche o respiratorie. Si sono evidenziate immediatamente, invece, lesioni iniziali alla coda fino alla sua totale eliminazione. A volte, insieme alla coda, veniva leso a morsi anche il muscolo dello sfintere, con conseguenti infezioni ascendenti che colpivano il midollo spinale e provocavano la formazione di ascessi nel canale midollare e, occasionalmente, paraplegie. Non si sono riscontrate lesioni ad orecchie, cosce o fianchi.
Nella stanza svezzamento, dove erano stabulati i soggetti nella fase critica, sono emerse subito due anomalie: i suini sporcavano nella zona di riposo e si ammucchiavano sul grigliato, nella zona predisposta alla defecazione. Gli animali si comportavano come se avessero freddo nonostante la temperatura fosse di circa 27 gradi centigradi.
Il sistema di ventilazione, gestito da una centralina, era costituito da 20 bocchette, distribuite in due file da dieci, per il passaggio dell'aria dall'esterno e da ventilatori centrali a soffitto tipo camino, dotati di ventola in aspirazione e farfalla per la regolazione del flusso dell'aria.
Nel periodo estivo sia la velocità dei ventilatori che le aperture delle bocchette di entrata

dell'aria erano registrate sempre al massimo per abbassare la temperatura interna della stanza. Mentre nella prima fase dello svezzamento il set point della centralina veniva tenuto alto per mantenere le temperature opportune, la curva di ventilazione e il flusso dell'aria aumentavano progressivamente fino a raggiungere i parametri massimi impostati dall'allevatore. In questo modo cercava di evitare che la temperatura risultante dalla somma di quella ambientale interna e quella prodotta dai suini fosse eccessivamente elevata.
Per poter comprendere appieno il funzionamento e gli effetti della ventilazione sull'ambiente si è proceduto a creare le medesime condizioni estive e si è eseguita una prova con i fumi per valutare il moto delle correnti d'aria. Dunque, in una stanza vuota si sono aperte le bocchette, posizionati i ventilatori alla massima velocità e la farfalla in massima apertura.
Si è potuto osservare che l'aria in entrata, anziché essere aspirata dai ventilatori a soffitto veniva deviata nella zona di stabulazione degli animali e ciò provocava un disturbo continuo che li rendeva nervosi. Questi, per cercare un riparo, si ammassavano nella zona meno esposta, ossia quella più vicina al corridoio sul grigliato (Fig.1e 2). Il nervosismo e il disagio conseguenti spingeva gli animali a mordersi la coda.

Figura 1. Suini ammassati sul grigliato

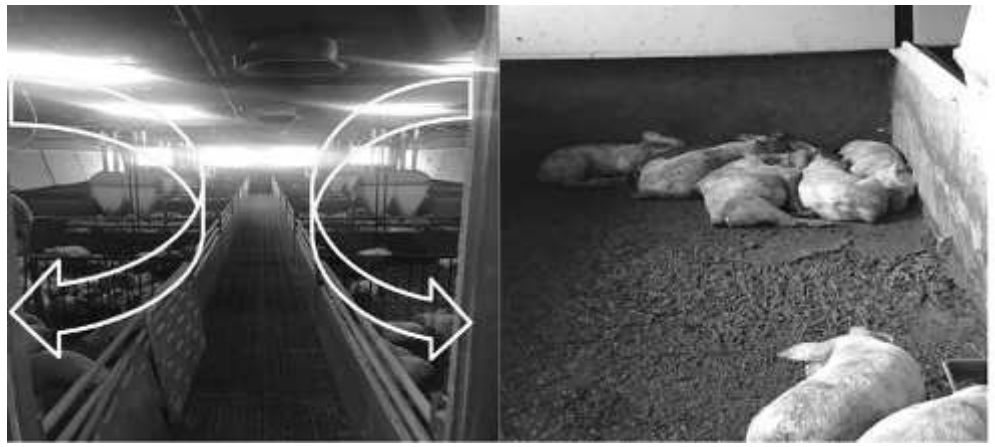


Figura 2. Reparto svezzamento, flusso dell'aria in entrata. Suini con coda morsicata

DISCUSSIONE

La morsicatura della coda è una turba del comportamento che, nel caso clinico descritto, ha assunto una particolare evidenza e diffusione. Di norma questo stato compare in una parte minoritaria della popolazione e non si accompagna a gravi lesioni nervose o a malattie organiche. Come tutte le turbe comportamentali, deve essere considerata alla stregua di un tentativo dell'organismo di fronteggiare, fisiologicamente od emozionalmente, condizioni inopportune: in questo caso le correnti d'aria. Il conseguente sovraffollamento in una zona specifica, induceva gli animali a compiere atti di cannibalismo per scaricare lo stress accumulato.
Nell'ambito della sindrome comportamentale particolare rilievo assumono le cause legate a problemi di alimentazione e di interazione sociale all'interno del gruppo. Nella manifestazione sintomatologica questi aspetti danno luogo ad una vasta gamma di comportamenti che si discostano, in maniera più o meno evidente, da quelli che rientrano nei parametri di normalità. Le principali disfunzioni comportamentali si manifestano con un aumento dell'aggressività, con combattimenti tra individui per stabilire una gerarchia nel gruppo e con il cannibalismo della coda. In quest'ultimo caso le carenze alimentari possono ricoprire un ruolo determinante, anche se poi altri fattori intervengono a determinare l'insorgenza del problema: affollamento, insufficiente distribuzione di alimenti o acqua, gruppi troppo grandi, stress e, ultimo ma non meno importante, la componente genetica. Nel caso esposto sembra evidente una inadeguatezza climatica all' interno dei box, dove la velocità dell'aria, troppo elevata causa numerosi e gravi problemi di disadattamento.
Per verificare la validità di questa ipotesi, si sono cambiati i parametri che influivano sulla temperatura e sulle variazioni minime e massime della ventilazione.
Le formule applicate, relative alla percentuale minima, intermedia e massima, fanno riferimento al saggio pubblicato da Jay D. Harmon.
Innanzi tutto, si è determinata la percentuale di ventilazione minima durante la stagione fredda (**W**), percentuale necessaria a mantenere la qualità dell'aria e l'umidità in condizioni accettabili e a minimizzare le perdite di calore (raccomandazioni esposte in tab 1). Per calcolare la percentuale minima di ventilazione, bisogna conoscere il numero e la taglia degli animali nello spazio da ventilare. Si moltiplica il numero degli animali per la quota di aria fredda nel tempo, espressa in metri cubi di aria al minuto (mcm).

Tabella 1

Categoria	Peso	Quota di aria fredda mcm/unità	Quota di aria calda mcm/unità
Scrofe e nidiata	400	0,57	14,16
Suinetti svezzamento	12-30	0,057	0,71
	30-75	0,085	0,99
Suini ingrasso	75-150	0,20	2,12
	150-250	0,28	3,40
Scrofe in gestazione	325	0,34	4,24
Verri e scrofe in copertura	400	0,40	8,5

Da MWPS-8 "Swine Housing and Equipment Handbook," MidWest Plan Service, Ames, Iowa.
W = N° animali X quantità aria fredda (mcm/animale) = mcm (quantità di aria da espellere espressa in metri cubi al minuto).
Poi si è proceduto a determinare la percentuale massima di ventilazione (S) utile a rimuovere una quantità d'aria sufficiente ad abbassare di qualche grado la temperatura interna senza creare turbolenze:
S = N° animali X quantità aria calda (mcm/animale) = mcm (quantità di aria da espellere espressa in metri cubi al minuto).
Infine, si sono calcolati gli stadi di ventilazione intermedia, basati, rispettivamente, sulla stagione fredda, quella calda e due situazioni intermedie. Il numero di stadi dipenderà dalla disponibilità di ventilatori appropriati. Nel caso esposto i ventilatori erano tre per stanza e c'era la possibilità di regolare il flusso dell'aria mediante una farfalla posta all'entrata dell'aria di uscita.

Intermediate ventilation rate formula (I1) :

$$(I1) = \frac{(S) - (W)}{(\text{no. of stages} + 2)} + (W) \quad \text{mcm}$$

Intermediate ventilation rate formula (I2) :

$$(I2) = \frac{2 \times \{(S) - (W)\}}{(\text{no. of stages} + 2)} + (I1) \quad \text{mcm}$$

L'entrata dell'aria avveniva attraverso delle bocchette poste ai lati della stanza, comandate dalla stessa centralina e in correlazione con la velocità dei ventilatori, mentre le temperature erano regolate in base alla taglia dell'animale e alla quota di alimento ingerito. Si è tenuto conto della temperatura critica superiore al di sopra della quale il suino deve usare l'energia

dell'alimento ingerito per liberarsi dal calore in eccesso. Nonostante sia importante stabulare i suini nella zona di termoneutralità, nel periodo in questione si è preferito tenere la temperatura più vicino a quella critica superiore perché:

1. quando la temperatura esterna è molto alta riesce difficile mantenere la temperatura bassa all'interno;
2. se non è possibile raggiungere il livello massimo di ingestione non c'è ragione di tenere le temperature vicino alla termoneutralità, date le temperature elevate;
3. i costi energetici aumentano se si vuole abbassare la temperatura interna con la ventilazione forzata.

Dunque l'unica soluzione valida è quella di rinfrescare l'aria con i cooling o altri sistemi idonei.
In conclusione, dato che i sistemi di ventilazione devono offrire condizioni di vita ottimali ai suini, una loro corretta gestione permette di ricambiare l'aria a temperature basse, di allontanare gas nocivi, polveri, vapore acqueo e agenti patogeni che potrebbero creare focolai di malattie respiratorie. Quando la temperatura risulta troppo alta si dovrà prestare attenzione ad abbassarla senza creare correnti d'aria che possano infastidire gli animali ed indurli ad assumere comportamenti deviati.

BIBLIOGRAFIA

Harmon J. D., *Mechanical Ventilation Design Worksheet for Swine Housing*, Iowa State University, 1999.

DESCRIZIONE DI UN GRAVE EPISODIO DI PASTEURELLOSI NELLE SCROFE

SEVERE OUTBREAK OF PASTEURELLOSIS IN SOWS

MARRUCHELLA G.,[1] DI FRANCESCO C.E.,[1] TRACHTMAN R.,[1] MOSCA F.,[1] SEBASTIANI C.,[3] DI PROVVIDO A.,[1,2] TISCAR P.G.,[1] MAGISTRALI C.[3]

[1]Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, località Piano d'Accio, 64100, Teramo, Italia; [2]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Campo Boario, 64100, Teramo, Italia; [3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, via Salvemini 1, 06126, Perugia, Italia.

Parole chiave: *Pasteurella multocida*, scrofe, fattori di virulenza
Keywords: *Pasteurella multocida*, sows, virulence factors

RIASSUNTO

Pasteurella multocida è fra i patogeni respiratori più comuni ed importanti del suino, specie nella quale può sostenere varie forme di malattia: rinite atrofica progressiva, broncopolmonite, occasionalmente setticemia. Si riportano le principali caratteristiche clinico-patologiche di un grave episodio di pasteurellosi, recentemente verificatosi in una scrofaia e che ha determinato il decesso del 15% dei riproduttori. Le indagini diagnostiche eseguite hanno dimostrato la presenza di *Pasteurella multocida* sierogruppo capsulare D quale unico patogeno responsabile dell'evento. Restano da chiarire le cause/concause che hanno determinato/favorito l'insorgenza di una sindrome respiratoria così grave. Da un punto di vista puramente speculativo, riteniamo plausibile che ciò sia dipeso dall'introduzione di un "nuovo" ceppo batterico, verso il quale non esisteva una adeguata immunità di popolazione. La comparsa improvvisa della sindrome in un effettivo di recente costituzione e la sua successiva risoluzione nell'arco di poche settimane deporrebbero a favore di questa ipotesi.

ABSTRACT

Pasteurella multocida is among the most common and important respiratory pathogens of pigs. In this species, it is able to sustain various forms of disease: progressive atrophic rhinitis, pneumonia (usually in grower/finisher pigs, as a secondary agent), and occasionally, septicaemia. The principal clinical and pathological characteristics of a severe episode of pasteurellosis, which took place in a sow farm and caused the death of 15% of sows, is herein described. Diagnostic testing indicated *Pasteurella multocida* capsular type D as the sole responsible pathogen involved in the event. The factors/co-factors which caused/promoted such a severe respiratory syndrome still need to be further understood. From a purely speculative point of view, we believe it plausible that this episode could have been caused by a "new" bacterial strain against which the population was not sufficiently immune. The sudden outbreak of the syndrome in a recently constructed group and its successive resolution in a time span of a few weeks, supports this hypothesis.

INTRODUZIONE

La mortalità delle scrofe è un problema emergente della suinicoltura, in grado di impattare negativamente, direttamente e indirettamente, sulla redditività dell'allevamento (Jensen et al., 2012). Il tasso di mortalità delle scrofe dovrebbe essere "idealmente" compreso fra il 3-6% su base annua. Tuttavia, valori pari al 7-9%, fino a picchi prossimi al 15%, si osservano con una certa frequenza e sono solitamente legati a specifici fattori causali, tipici di ogni

singola realtà aziendale (Muirhead et al., 2013).
La maggior parte degli episodi si verifica durante la gestazione e l'intervallo svezzamento-attesa calore. Non è semplice ottenere informazioni attendibili circa le cause di mortalità delle scrofe, dal momento che le indagini necroscopiche e/o diagnostiche di laboratorio sono eseguite saltuariamente in questa categoria di animali. Dai dati presenti in letteratura si evince che le patologie a carico dei sistemi/apparati locomotore (artriti, osteocondrosi), digerente (ulcere gastriche, torsioni, prolasso del retto), riproduttivo (distocia, prolasso uterino) ed urinario (cistiti, pielonefriti) sono quelle di più comune riscontro nelle scrofe decedute e/o sottoposte ad eutanasia. Per contro, le patologie respiratorie sono piuttosto rare e possono essere sostenute da vari agenti eziologici: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, PRRSV, virus influenzali etc. Ovviamente, gli episodi più gravi si verificano a seguito dell'introduzione di un "nuovo" patogeno respiratorio, in assenza di una idonea immunità di popolazione (Sanz et al., 2007; D'Allaire et al., 1991; Muirhead et al., 2013).
Si riportano di seguito le principali caratteristiche clinico-patologiche osservate nel corso di una grave sindrome respiratoria, recentemente verificatasi in una scrofaia.

MATERIALI E METODI
L'episodio si è verificato in un allevamento di medio-piccole dimensioni (sito 1), in precedenza rimasto vuoto per un lungo periodo di tempo. Da circa 3 mesi, vi erano state introdotte 150 scrofe, tutte provenienti da un unico allevamento. Le scrofe erano regolarmente vaccinate nei confronti della malattia di *Aujeszky*, della parvovirosi, del malrosso e della colibacillosi. L'attività riproduttiva era organizzata in bande trisettimanali; i suinetti venivano svezzati a 28 giorni di età e rimanevano in questo sito fino ai 2 mesi di vita. Successivamente, venivano trasferiti in un altro allevamento (sito 2), distante circa 5 Km dalla scrofaia, ove rimanevano fino al raggiungimento del peso di macellazione (circa 160 Kg).
Nel periodo compreso fra dicembre 2017 e gennaio 2018, una grave sindrome respiratoria ha colpito il parco scrofe sopra menzionato. Ai fini diagnostici, alcuni degli animali deceduti (n=6) sono stati sottoposti ad approfondite indagini necroscopiche e microbiologiche:
- esami batteriologici;
- indagini biomolecolari (*polymerase chain reaction*, PCR) nei confronti di *Mycoplasma* spp. (van Kuppeveld et al., 1994), *Influenzavirus* (Anonimo, 2015), PRRSV, PCV2 (Marruchella et al., 2017), *Coronavirus* spp. (Escutenaire et al., 2007).

RISULTATI
La sindrome respiratoria è comparsa improvvisamente ed ha colpito una percentuale molto elevata di scrofe, sia gestanti che in lattazione o in attesa calore. Principali sintomi rilevati: febbre, anoressia, dispnea, tosse, cianosi del grugno e della cute, agalassia. Nell'arco di un paio di settimane, la mortalità ha raggiunto valori prossimi al 15% dell'effettivo. Quale logica conseguenza, si è registrato il contestuale aumento della mortalità dei suinetti in sala parto, da attribuirsi all'agalassia delle scrofe, in assenza di patologie respiratorie nei lattonzoli.
In tutte le scrofe sottoposte a necroscopia è stata osservata la fuoriuscita di schiuma mista a sangue dalle narici (Figura 1) e la presenza di gravi lesioni polmonari, estese, bilaterali e simmetriche, con coinvolgimento pleurico. Le aree polmonari interessate erano di colore rosso scuro, nettamente demarcate, estremamente consolidate e rivestite da modiche quantità di fibrina (Figura 2). I linfonodi tributari erano notevolmente aumentati di volume, edematosi ed iperemici. In un paio di casi, si notava la contestuale presenza di petecchie emorragiche sulle sierose, di pericardite e peritonite siero-fibrinosa, linfo-adenomegalia generalizzata e splenomegalia.
Da tutti i polmoni oggetto di indagine è stata isolata in purezza *Pasteurella multocida* (*Pm*). In un caso, lo stesso batterio è stato isolato anche dall'essudato peritoneale e dalla milza. In base

alle prove di antibiogramma eseguite, tutti gli isolati si sono dimostrati sensibili nei confronti dei seguenti antimicrobici: marbofloxacina, amoxicillina, ceftiofur e fluorfenicolo. La successiva caratterizzazione biomolecolare di *Pm* (Cucco et al., 2016) ha stabilito che la stessa apparteneva al sierogruppo capsulare D ed era in grado di esprimere il solo fattore di virulenza hgbB. Tutte le indagini biomolecolari eseguite nei confronti degli altri patogeni respiratori hanno avuto esito costantemente negativo.
In sintesi, è stato possibile emettere la diagnosi di broncopolmonite e pleurite fibrinosa da *Pm*, con occasionale evoluzione sistemica del processo infettivo.
Sulla scorta dei risultati dell'antibiogramma, le scrofe sono state trattate con β-lattamici per via parenterale. La sindrome respiratoria si è risolta nell'arco di un paio di settimane e non sono stati riportati casi analoghi nei mesi successivi.

Figura 1. Scrofa. Fuoriuscita di schiuma mista a sangue dalle narici.
Figure 1. *Sow. Spillage of foam mixed with blood from the nostrils.*

Figura 2. Scrofa. Il polmone sinistro è quasi completamente iperemico e consolidato. Il deposito di modiche quantità di fibrina fa perdere alla pleura la sua naturale levigatezza.
Figure 2. *Sow. The left lung is almost completely hyperemic and consolidated. The deposite of moderate amounts of fibrin causes the pleura to lose its natural smoothness.*

DISCUSSIONE

Pm è un cocco-bacillo Gram-negativo, anaerobio facoltativo, in grado di crescere rigogliosamente su agar sangue producendo colonie non emolitiche e dal caratteristico odore dolciastro. Si tratta di un microrganismo molto diffuso e fra i più studiati fin dagli albori della batteriologia, in grado di sostenere numerose patologie in varie specie animali, come agente primario o secondario (Pascucci e Sidoli, 1998).

Nel suino, l'infezione da *Pm* è da ritenersi ubiquitaria e la sua presenza è facilmente dimostrabile nelle cavità nasali e nelle tonsille di soggetti clinicamente sani. *Pm* raramente causa broncopolmonite quale agente patogeno "primario"; più spesso, interviene a complicare infezioni sostenute *in primis* da virus o da *Mycoplasma hyopneumoniae*. Di fatto, la broncopolmonite da *Pm* rappresenta solitamente lo stadio conclusivo della polmonite enzootica o, più in generale, del cosiddetto "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine Respiratory Disease Complex*, PRDC) negli animali in fase di accrescimento/ingrasso (Pors et al., 2011; Register, 2012).

In Italia, così come nel resto nel mondo, la maggior parte dei ceppi isolati in corso di broncopolmonite appartengono al sierogruppo capsulare A, meno spesso al sierogruppo capsulare D, e sono frequentemente associati all'espressione del fattore di virulenza hgbB (Cucco et al., 2016; Davies et al., 2003). L'insorgenza di forme setticemiche da *Pm* (sierogruppo capsulare B e più raramente A o D) è da ritenersi del tutto occasionale nel suino e può manifestarsi in soggetti di ogni classe di età, con tassi di mortalità talvolta elevatissimi (Register, 2012).

L'episodio qui descritto mostra caratteristiche interessanti ed "atipiche" quanto a gravità, categoria degli animali coinvolti ed assenza di co-infezioni sostenute da altri patogeni respiratori. Difficile, se non impossibile, stabilire quali fattori ne abbiano determinato la comparsa. In base alla tipizzazione biomolecolare, è improbabile che ciò sia dipeso dalla presenza di particolari fattori di virulenza; di fatto, la combinazione sierogruppo capsulare D/hgbB+ non è infrequente nelle realtà produttive del nostro Paese (Cucco et al., 2016). Il contestuale coinvolgimento di scrofe gestanti ed in lattazione, in assenza di condizioni atmosferiche particolarmente sfavorevoli, ci porta ad escludere che le condizioni ambientali, in senso lato, abbiano svolto un ruolo patogenetico rilevante. In base ai dati anamnestici raccolti, sarebbe pure da escludersi l'esposizione a micotossine (fumonisina) quale concausa della sindrome respiratoria osservata. Pur rimanendo nel campo delle speculazioni, riteniamo più probabile che ciò sia risultato dall'introduzione di un "nuovo" ceppo di *Pm*, verso il quale non esisteva una adeguata immunità di popolazione. La comparsa improvvisa della sindrome in un effettivo di recente costituzione e la sua successiva risoluzione nell'arco di poche settimane deporrebbero a favore di questa seconda ipotesi.

In conclusione, *Pm* era e rimane uno dei patogeni respiratori più importanti e più studiati del suino. Ciononostante, l'epidemiologia e la patogenesi della pasteurellosi restano ancora in ampia parte sconosciute. Gli strumenti di indagine attualmente disponibili potrebbero contribuire alla comprensione di tali aspetti, pre-requisito fondamentale per una gestione razionale ed efficace del problema.

BIBLIOGRAFIA

1. Anonimo. (2015) "Influenza A virus of swine" in "Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals 2015". OIE. 2.8.7., 1-14.
2. Cucco L., Massacci F.R., Sebastiani C., Mangili P., Bano L., Cocchi M., Luppi A., Ortenzi R., Pezzotti G., Magistrali C.F. (2016) "Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Pasteurella multocida* strains isolated from hosts affected by various diseases in Italy". Vet It. 53, 21-27.
3. D'Allaire S., Drolet R., Chagnon M. (1991) "The causes of sow mortality: A retrospective study". Can Vet J. 32(4), 241-3.
4. Davies R.L., MacCorquodale R., Baillie S., Caffrey B. (2003) "Characterization and comparison of *Pasteurella multocida* strains associated with porcine pneumonia and atrophic rhinitis". J Med Microbiol. 52(Pt 1), 59-67.
5. Escutenaire S., Mohamed N., Isaksson M., Thorén P., Klingeborn B., Belák S., Berg M., Blomberg J. (2007) "SYBR Green real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for the generic detection of coronaviruses.". Arch Virol. 152, 41-58.
6. Jensen T.B., Toft N., Bonde M.K., Kongsted A.G, Kristensena A.R., Sørensen J.T., (2012) "Herd and sow-related risk factors for mortality in sows in group-housed systems". Prev Vet Med. 103(1):31-7.
7. Marruchella G., Valbonetti L., Bernabò N., Ligios C. (2017) "Depletion of follicular dendritic cells in tonsils collected from PMWS-affected pigs". Arch Virol. 162(5):1281-1287.
8. Muirhead M.R., Alexander T.J. (2013) "Managing Health in the gestation/Dry Period" in "Managing Pig Health". 2a ed., Sheffield, 5m Publishing. 227-262.
9. Pascucci S, Sidoli L. (1998) "Pasteurella" in Farina R., Scatozza F. "Trattato di Malattie infettive degli animali". 2a ed., Torino, UTET. 190-201.
10. Pors S.E., Hansen M.S., Bisgaard M., Jensen H.E. (2011) "Occurrence and associated lesions of *Pasteurella multocida* in porcine bronchopneumonia". Vet Microbiol. 150(1-2), 160-6.
11. Register K.B., Brockmeier S.L., de Jong M.F., Pijoan C. (2012) "Pasteurellosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Diseases of Swine". 10a ed., Oxford, Wiley-Blackwell. 798-809.
12. Sanz M., Roberts J.D., Perfumo C.J., Alvarez R.M., Donovan T., Almond G.W. (2007) "Assessment of sow mortality in a large herd". J Swine Health Prod. 15(1), 30–36.
13. van Kuppeveld F.J., Johansson K.E., Galama J.M., Kissing J., Bölske G., van der Logt J.T., Melchers W.J. (1994) "Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR". Appl Environ Microbiol. 60, 149–152.

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI MELOXIDYL® 20mg/ml ALLE SCROFE NEL PERIPARTO ASSOCIATO O MENO A TRATTAMENTO ANTIBIOTICO CON LONGOCILLINA L.A.® 150mg/ml: STUDIO PRELIMINARE

EFFECT OF MELOXICAM ADMINISTRATION IN PERIPARTURIENT SOWS IN ASSOCIATION OR NOT WITH ANTIBIOTIC TREATMENT: PRELIMINARY STUDY

ORTOLAN T.[1], PESCE C.[1], SCOLLO A.[1], ROMANO G.[1], MAZZONI C.[1], CASAPPA P.[2]

[1]Suivet, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia; [2]Ceva Italia

Parole chiave: Meloxicam, scrofe, periparto
Key words: Meloxicam, sows, peripartum

RIASSUNTO
Il parto, nella scrofa, rappresenta l'evento più stressante di tutta la gravidanza. In particolare, il momento del parto e le ore successive la nascita dei suinetti sono circostanze delicate per la scrofa, poiché sensibile a potenziali infezioni siano esse generali (coinvolgendo ad esempio il sistema respiratorio) o meno. Attualmente viene accettato che, in tutte le specie, il parto rappresenti un processo che, anche nel caso in cui le dimensioni della prole siano relativamente piccole, porti al rischio di dolore intenso in caso, ad esempio, di distocia o di scrofe giovani che partoriscano suinetti di grossa taglia. Secondo la letteratura, questo tipo di disagio, associato alla azione di alcuni patogeni e alla febbre, sembra incidere negativamente sia sull'assunzione di colostro che, di conseguenza, sulla mortalità pre-svezzamento. Lo scopo di questo studio è stato valutare gli effetti che la somministrazione post-parto di meloxicam, da solo o in associazione con amoxicillina, determina sul benessere, sulle condizioni generali della scrofa e di conseguenza sulle performance del riproduttore e sulla sopravvivenza e crescita dei suinetti.

ABSTRACT
The farrowing process is the most stressful time during a sow's pregnancy. Sows are vulnerable to many kind of infections (involving in example respiratory apparatus) or other organs and tissues at the time of farrowing and shortly after giving birth to their young piglets. Moreover, it is generally accepted that parturition in any species is a painful process, even in species that give birth to relatively small offspring there is potential for considerable pain to occur in the case of dystocia or small parity sows farrowing large piglets. As consequence of discomfort, associated to pathogens' action and fever, pre-weaning mortality and reduced colostrum intake are reported. Objectives of this study was to determine the effects of meloxicam alone or in association with amoxicillin administered to sows shortly after parturition on sow general conditions, welfare and performance, and on piglet survival and growth.

INTRODUZIONE
È ormai ampiamente accettato che anche gli animali sono in grado di provare dolore (Sneddon et al., 2014), e recenti ricerche sono state rivolte allo studio del dolore nelle scrofe associato al parto (Mainau e Manteca, 2011).
Fisiologicamente, il dolore del parto è dovuto alle contrazioni uterine e all'espulsione dei

suinetti, che portano, di conseguenza, ad un'inevitabile infiammazione del tratto uterino (Mainau e Manteca, 2011). Questo dolore tende però a prolungarsi anche nei momenti successivi al parto, determinando un ritardo nei tempi di recupero, una minore assunzione di cibo e acqua e una minore eiezione di latte, influenzando così negativamente la capacità della scrofa di nutrire e prendersi cura dei suoi suinetti (Mainau e Manteca, 2011; Peltoniemi e Olivero, 2015). Inoltre è stato osservato che in concomitanza del parto le condizioni fisiche della scrofa subiscono un peggioramento anche a causa della presenza di forme respiratorie (spesso dovute a *P. multocida*, *B. bronchispetica*, complicate da *S.suis*) che determinano febbre ed in generale uno scadimento delle condizioni fisiche generali degli animali colpiti. Tutto questo diventa motivo di preoccupazione per il benessere sia della scrofa che dei suinetti, oltre a determinare un rischio di danno economico per l'allevatore. Il successo del parto rappresenta un tassello fondamentale per l'allevamento suinicolo, in quanto si traduce in un maggior numero di suinetti svezzati e, di conseguenza, in maggiori entrate economiche. La buona salute e il benessere della scrofa, infatti, si riflettono inevitabilmente sulla nascita e crescita di suinetti in salute (Sarah et al., 2018); qualsiasi difficoltà legata al parto o una minore produzione di latte da parte della scrofa possono determinare, viceversa, una maggiore perdita di suinetti prima del loro svezzamento (Peltoniemi e Olivero, 2015). In condizioni di campo, difatti, i sintomi riscontrati nelle scrofe dopo il parto, come la presenza di febbre e il calo dell'appetito, conducono a problemi di lattazione più o meno gravi, con conseguente aumento della mortalità pre-svezzamento (Tummaruk e Sang-Gassanee, 2012).
Tutto ciò ha portato alla necessità di eseguire diverse ricerche sulla somministrazione di farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) appena dopo il parto a completamento della terapia antibatterica, al fine di misurarne i benefici per la salute e il benessere della scrofa (Homedes et al., 2014; Viitasaari et al., 2014) e dei suinetti (Mainau et al., 2012). Inoltre, la somministrazione di FANS in associazione con chemioterapici ha dimostrato di essere d'aiuto nel trattamento delle cause infettive che possono avere tra gli esiti la sindrome da disglassia post-partum (PPDS) (Hirsch et al., 2003; Tummaruk e Sang-Gassanee, 2012), registrando anche un calo della mortalità pre-svezzamento negli allevamenti con un'alta incidenza di forme subcliniche di PPDS (Sabaté et al., 2012). Tra i FANS più conosciuti rientra il meloxicam che, in Italia, è autorizzato per il trattamento di disturbi locomotori non infettivi, riducendo i sintomi di zoppia e infiammazione (Friton et al., 2003) e, come terapia, per il trattamento della sindrome mastite-metrite-agalassia (MMA) (Mainau et al., 2011; Hirsch et al., 2003).
Lo scopo di questo studio è stato, quindi, valutare l'effetto della somministrazione intramuscolare di meloxicam nelle scrofe nel periparto, associato o meno ad antibiotico, con l'aspettativa che, attenuando il dolore e l'infiammazione post-parto e intervenendo sulle forme respiratorie che spesso sono presenti in questa fase, si riduca il periodo di disagio e, di conseguenza, migliorino il benessere e le performance delle scrofe e la sopravvivenza e la crescita dei suinetti.

MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in una scrofaia convenzionale intensiva sita nella provincia di Treviso (Italia), in accordo con la Legislazione Italiana sul benessere animale (DL n.122/2011). L'allevamento ospita sia la scrofaia, con la presenza di circa 900 scrofe, che lo svezzamento, in cui vengono trasferiti i suinetti al termine della lattazione. L'allevamento è gestito in banda settimanale e circa 60 scrofe alla settimana vengono condotte al parto, abitualmente indotto il giovedì, con espletamento del parto il venerdì e pareggiamento dei suinetti entro le 24 ore. La genetica presente in allevamento è Topigs e il periodo di lattazione ha una durata di 28 giorni. Le scrofe ricevono un'alimentazione liquida automatica e alloggiano in gabbie parto

di tipo convenzionale, distribuite su due capannoni.
Lo studio ha coperto un arco di tempo compreso tra il 17 novembre 2017 e il 24 febbraio 2018 e ha visto coinvolte un totale di 120 scrofe e relative nidiate, con ordine di parto compreso tra 1 e 10. Nella Tabella 1 sono riassunti i principali dati relativi all'intero gruppo di studio.

Parametro	**Valori medi degli animali selezionati**
Ordine di parto	3,4 parti
Nati totali	13,5
Nati vivi	13,1
Mummificati	0,6

Tabella 1. Valore medio dei parametri principali considerabili in una scrofa, relativi all'intero gruppo di studio.
Table 1. *Mean value of the main parameters considered in a sow, relative to the whole study group.*

Al fine dello studio sono stati creati 4 gruppi (30 scrofe per gruppo), in base al tipo di trattamento somministrato:

- Antibiotico (amoxicillina - Longocillina®L.A. 150mg/ml)
- FANS (meloxicam - Meloxidyl® 20mg/ml)
- Amoxicillina + meloxicam (Longocillina®L.A. 150mg/ml + Meloxidyl® 20mg/ml)

Controllo negativoLa scelta delle scrofe è stata randomizzata ed è avvenuta il giorno stesso del parto, essendo le condizioni ambientali identiche in tutte le sale parto dell'allevamento. I farmaci venivano somministrati, seguendo le indicazioni dei rispettivi foglietti illustrativi, intramuscolo, circa 1,5-2 ore dopo la fine del parto. Inoltre, ogni scrofa disponeva di una propria scheda personale in cui venivano annotati tutti gli eventi del parto: numero di parto, durata totale del parto (tempo intercorso dalla nascita del primo suinetto all'ultimo), numero di nati morti, numero di nati totali, numero di mummificati, numero di esplorazioni uterine.
Durante la prova sono stati presi in considerazione i parametri relativi alla scrofa, ovvero la temperatura rettale, lo spessore del lardo dorsale e la manifestazione di ulcera della spalla, e alcuni parametri relativi ai suinetti, quali la loro sopravvivenza e il loro accrescimento. La temperatura rettale è stata misurata mediante termometro digitale al momento del parto (T0) e il giorno seguente (24 ore dopo, T1).
Lo spessore del lardo dorsale è stato misurato mediante un apposito misuratore (Renco Lean Meater) a livello del dorso della scrofa, in corrispondenza dell'ultima costola e 5-8 cm lateralmente alla colonna vertebrale, punto denominato P2 (Dejan et al., 2008). Le rilevazioni sono state fatte al momento del parto (T0), a metà lattazione (T14) e allo svezzamento (T28).
Per quanto riguarda le ulcere della spalla, sono state effettuate delle foto della spalla destra di ciascuna scrofa e successivamente sono state revisionate e classificate secondo la scala di punteggio suggerita da Herskin et al. (2011) (Figura 1):

- 0 = Nessun segno di lesione;
- 1 = Ulcera della cute limitata alla sola epidermide, dunque molto superficiale, talvolta con tracce di desquamazione;
- 2 = Ulcera più profonda che include il derma, talvolta in presenza di croste e tessuto di granulazione sui bordi della lesione;
- 3 = Ulcera molto profonda accompagnata da abbondante tessuto fibrotico e di granulazione;
- 4 = Tessuto osseo/cartilagineo esposto.

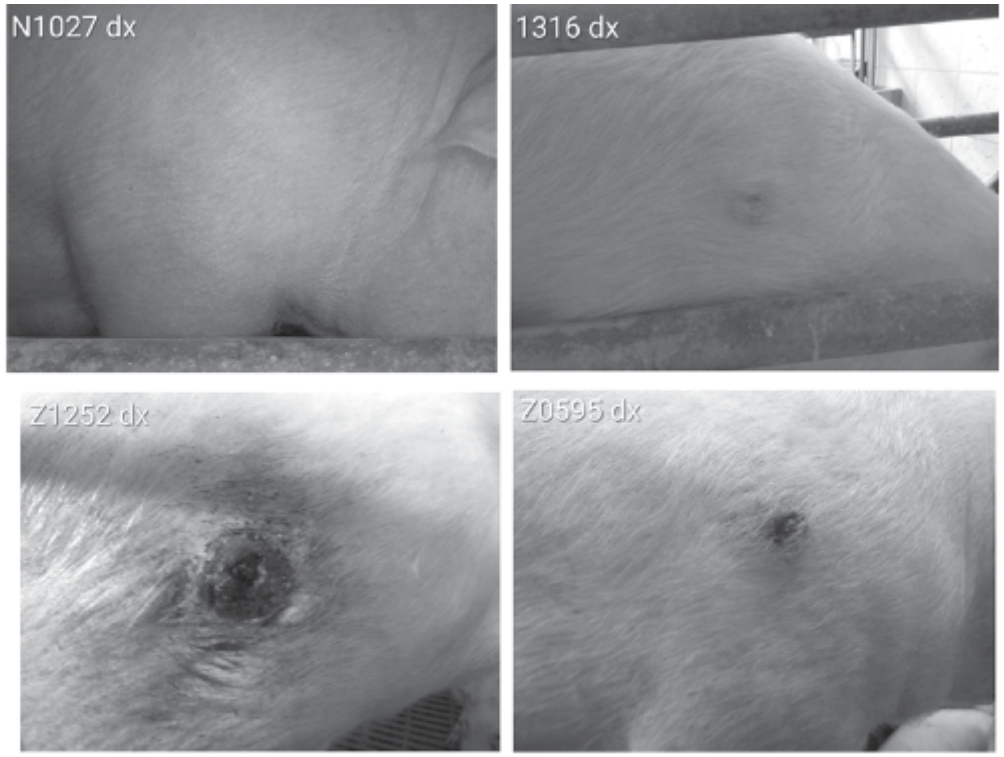


Figura 1. A partire da in alto a sinistra, in senso orario: score 0, 1, 2, 3 dell'ulcera della spalla nella scrofa.
Figure 1. *Starting from the top left, clockwise: score 0, 1, 2, 3 of the shoulder sores in sow.*

Anche per l'ulcera della spalla, le rilevazioni sono state fatte al giorno del parto (T0), a metà lattazione (T14) e allo svezzamento (T28).
Per quanto riguarda la sopravvivenza dei suinetti, è stato registrato qualsiasi episodio di mortalità avvenuto durante la lattazione mediante la compilazione di apposite schede.
L'accrescimento dei suinetti, invece, è stato rilevato mediante pesatura delle singole nidiate la mattinata dopo il parto, in modo che i suinetti fossero già pareggiati, e allo svezzamento.

Analisi statistica
Per l'analisi delle medie tra gruppi per i parametri legati alla temperatura rettale, lo spessore del lardo dorsale e la manifestazione di ulcera della spalla, l'accrescimento dei suinetti, è stato usato un t-test. Per l'analisi delle frequenze legate alla mortalità in svezzamento invece, è stato effettuato il test del chi-quadro.

RISULTATI
La somministrazione congiunta di antibiotico + meloxicam ha determinato una più rapida ed evidente ripresa della temperatura fisiologica della scrofa dopo il parto. Il gruppo in questione ha infatti evidenziato un decremento della temperatura tra il giorno del parto ed il giorno successivo pari a 5 volte il decremento del gruppo controllo. Intermedia invece la risposta dei gruppi di trattamento con il solo antibiotico o il solo FANS, come illustrato nel Grafico 1.

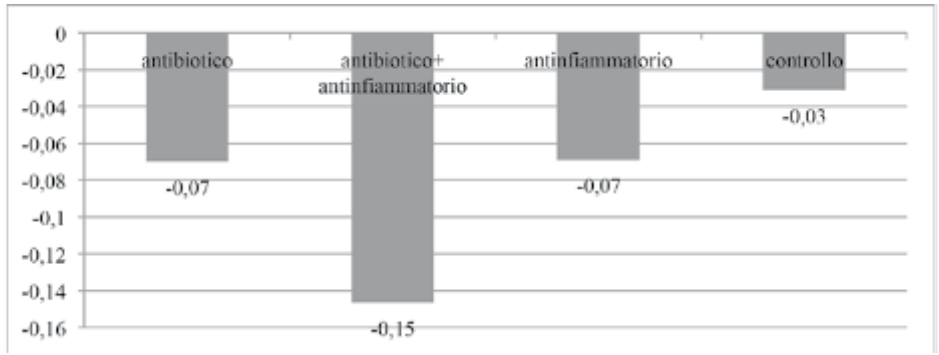


Grafico 1. Calo della temperatura corporea (°C) delle scrofe dal giorno del parto al giorno successivo.
Graphic 1. *Decrease in body temperature (°C) of the sows at the day of farrowing and the day after.*

Per quanto riguarda lo spessore del lardo dorsale in P2, al giorno zero si è riscontrata un'incidenza leggermente maggiore di scrofe più magre nel gruppo controllo, senza però evidenziare alcuna differenza significativa. Il gruppo controllo ha però perso più condizione corporea rispetto agli altri gruppi, soprattutto tra il giorno del parto ed il giorno 14 di lattazione (Grafico 2).

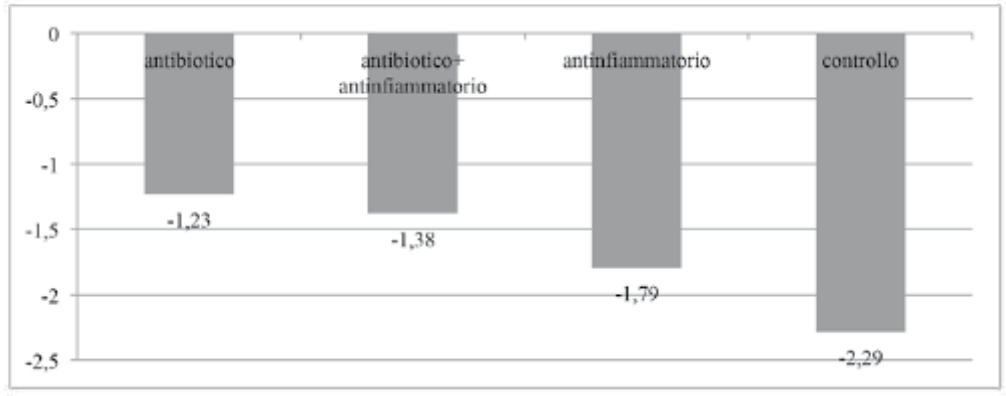


Grafico 2. Perdita di condizione corporea (mm di spessore di lardo dorsale in P2) delle scrofe tra il giorno del parto ed il giorno 14 di lattazione.
Graphic 2. *Body condition loss (mm of backfat in P2) of the sows between the day of farrowing and the 14th day of lactation.*

In particolare, lo spessore del lardo dorsale tende ad essere maggiore nel gruppo trattato con amoxicillina rispetto al gruppo controllo sia a 14 giorni di lattazione (17,1 vs 15,3 con P=0.10) che allo svezzamento (15,4 vs 13,9 con P=0.16), così come una simile ma più accentuata tendenza è emersa confrontando il gruppo trattato con meloxicam + amoxicillina e il gruppo controllo (17,3 vs 15,3 con P=0.08 a 14 gg; 15,8 vs 13,9 con P=0.07 a 28 gg). I valori sono riportati anche in Tabella 2.

Gruppi di trattamento	P2 (0 gg)	P2 (14 gg)	P2 (28 gg)
Antibiotico	18,4	17,1	15,4
Antibiotico + antinfiammatorio	18,7	17,3	15,8
Antinfiammatorio	18,2	16,4	14,4
Controllo	17,5	15,3	13,9

Tabella 2. Spessore del lardo dorsale delle scrofe in P2 al giorno del parto (0 gg), a metà lattazione (14 gg) e allo svezzamento (28 gg).
Table 2. *Backfat thickness of sows in P2 at day of farrowing (0 gg), half lactation (14 gg) and weaning (28 gg).*

Dall'analisi statistica non sono state evidenziate differenze significative a favore dei gruppi trattati per quanto riguarda la manifestazione di ulcera della spalla della scrofa; allo stesso modo la mortalità pre-svezzamento e l'accrescimento dei suinetti non hanno mostrato differenze significative tra i diversi gruppi di studio, anche se il gruppo controllo ha svezzato animali più leggeri rispetto agli altri gruppi (Tabella 3).

Gruppi di trattamento	Peso medio (0 gg)	Peso medio (28 gg)	Incremento peso 28 gg
Antibiotico	1,19	6,53	5,34
Antibiotico + antinfiammatorio	1,21	6,47	5,04
Antinfiammatorio	1,26	6,63	5,36
Controllo	1,11	6,26	4,94

Tabella 3. Peso medio al giorno della nascita (0 gg) e allo svezzamento (28 gg) e incremento di peso avuto nei 28 giorni di lattazione.
Table 3. *Average weight on the day of birth (0 gg) and weaning (28 gg) and weight gain in the 28 days of lactation.*

DISCUSSIONE

Il parto rappresenta un processo intrinsecamente rischioso sia per la madre che per la prole; lesioni, traumi e infiammazioni associati, infatti, possono avere importanti effetti negativi sulla salute, il benessere e la produttività in tutte le specie di allevamento (Mainau e Manteca, 2011). Di per sé il parto è doloroso, ma se ad esso sono associate difficoltà o fenomeni distocici il dolore provocato potrebbe portare addirittura al disinteressamento della prole. (Mainau e Manteca, 2011).
La somministrazione di FANS dopo il parto dovrebbe ridurre l'infiammazione e il dolore ad esso associato, migliorare la salute e il benessere della scrofa e mantenere, o perfino migliorare, la successiva fertilità e lattazione (Richards et al., 2009). I FANS alleviano il dolore e l'infiammazione riducendo la sintesi di prostaglandine (Engelhardt e Trummlitz, 1990) attraverso l'inibizione degli enzimi della ciclo-ossigenasi (COX; Engelhardt, 1996), che aumentano in seguito a fenomeni di danno cellulare (Hudson et al.,2008), esercitando così effetti antinfiammatori, antitossici, antiessudativi, analgesici e antipiretici (Friton et al., 2006). In particolare, il meloxicam è molto usato nel trattamento delle setticemie e tossiemie legate PPDS e della MMAS, con effetti benefici riportati sulla scrofa (Hirsch et al., 2003).
Molti studi hanno dimostrato che la temperatura corporea della scrofa aumenta

fisiologicamente, fino a 1-1,5°C in più rispetto alla norma, a partire da 24-48 ore prima del parto fino a 12 ore prima (Peltoniemi e Oliviero, 2019; Noakes, 2001). Il mantenimento della temperatura corporea sui 39-39,5°C (a seconda degli autori: Tummaruk e Sang-Gassanee, 2013; Osterlundh et al., 2002) anche il giorno dopo il parto è, però, indice di scarso benessere, febbre legata a fenomeni infettivi, piressia, minor recupero post-parto e ritardo nella lattazione. Il nostro studio ha riportato una ripresa rapida ed evidente della temperatura corporea fisiologica in seguito alla somministrazione di meloxicam + antibiotico, con risposte intermedie per i gruppi trattati solo con meloxicam o solo con antibiotico. Il gruppo controllo non ha invece avuto notevoli decrementi di temperatura, rimanendo quindi in uno stato di infiammazione e, presumibilmente, di sofferenza per un periodo di tempo maggiore rispetto agli altri tre gruppi sperimentali.
Diversi studi, inoltre, dimostrano che scrofe con febbre tendono a rifiutare il cibo, evidenziando un comportamento legato a malattia (McGlone et al., 1993; Weary et al., 2008), e ad incorrere in un deterioramento della condizione corporea (Viitasaari et al., 2013), che va peggiorando soprattutto dopo le prime 2 settimane di lattazione (Valros et al., 2003). Secondo bibliografia (Anil et al., 2008), l'utilizzo del FANS può diminuire la perdita di peso corporeo della scrofa dal 14° giorno dopo il parto, condizione particolarmente importante per il successo riproduttivo della scrofa e per ridurne il rischio di riforma. Anche nel nostro studio le scrofe trattate con amoxicillina e, ancor di più, quelle trattate con meloxicam + amoxicillina hanno dimostrato un miglior mantenimento della condizione fisica generale e dello spessore del lardo dorsale sia a 14 che a 28 giorni di lattazione, confermando i dati trovati in bibliografia. In particolare, il gruppo controllo ha subito una evidente perdita di condizione corporea, soprattutto nei primi 14 giorni post-parto, sottolineando uno stato di benessere inferiore. Questo aspetto deve essere tenuto assolutamente in considerazione, poiché le scrofe che alla fine della lattazione mostrano un'eccessiva perdita di condizione corporea e un'eccessiva diminuzione dello spessore del lardo dorsale sono più predisposte ad avere un intervallo svezzamento-estro (ISE) più lungo nel ciclo successivo, come anche un minor tasso di concepimento all'accoppiamento successivo (Eissen et al., 2000). Le scrofe che non riescono a tornare in estro e che ricevono l'inseminazione a 7 giorni dallo svezzamento hanno ridotte performance riproduttive, aumentando il numero totale di giorni improduttivi (Koketsu, 2005) e determinando ingenti danni economici all'allevatore.
Inoltre, scrofe con una scarsa condizione corpora sono più a rischio nello sviluppo di ulcere della spalla (Tantasuparuk et al., 2001; Bonde et al., 2004; Maes et al., 2004). Viitasaari et al. (2013) riportano risultati statisticamente significativi a favore di scrofe trattate con FANS rispetto a scrofe trattate con placebo nei giorni 3, 4, e 5 dopo il parto, avendo le prime una condizione corporea e uno spessore del lardo dorsali migliori rispetto alle seconde. I dati estrapolati dal nostro studio non hanno potuto né confermare né smentire gli studi precedenti, in quanto non sono state registrate differenze significative tra i vari gruppi sperimentali.
Per quanto riguarda la mortalità dei suinetti, invece, è importante sapere che questa si manifesta principalmente nei primi 4 giorni di vita, anche se il periodo più critico ricopre le prime 24 ore di vita (Tummaruk e Sang-Gassanee, 2012). Una causa di mortalità nei suinetti durante le prime ore di vita può essere la debilitazione e l'ipertermia dovuti alla scarsa assunzione di colostro (Mainau et al., 2012), che non permette un adeguato trasferimento dell'immunità materna al suinetto e si traduce in un minore accrescimento durante la lattazione (Milligan et al., 2002). Negli ultimi anni sono state fatte numerose ricerche inerenti ai fattori che possono compromettere l'abilità della scrofa nel produrre una giusta quantità e qualità di latte, con lo scopo di aumentare la crescita dei suinetti e di ridurre al minimo il tasso di mortalità (Kemper e Gerjets, 2009; Papadopoulos et al., 2010). La causa principale sembra risiedere nello stato di salute della scrofa a fine parto, in quanto la persistenza di dolore, infiammazione e febbre,

e di infezioni respiratorie o di altro tipo (setticemie), riducono l'appetito della scrofa, con conseguente calo di condizione corporea, minore eiezione del latte e disinteresse verso la propria prole. La bibliografia riporta, infatti, che i parti lunghi o problematici sono associati ad un aumento della mortalità pre-svezzamento nei suinetti (Alonso-Spilsbury et al., 2005). Hirsch et al. (2003) hanno però constatato che il tasso di mortalità nei suinetti nati da madre con la MMA può essere ridotto mediante somministrazione intramuscolare di meloxicam. Il nostro studio, tuttavia, non ha rilevato alcuna differenza significativa in relazione alla mortalità pre-svezzamento nei 4 gruppi sperimentali, confermando invece i risultati avuti da Mainau et al. (2011) in merito al medesimo argomento. Dall'analisi dei nostri dati è stato solo possibile osservare un peso più leggero allo svezzamento nei suinetti del gruppo controllo, anche se non significativo, ma comunque in linea con le evidenze riscontrate negli altri parametri. Il gruppo controllo, che non ha ricevuto alcuna somministrazione di farmaco, ha infatti dimostrato avere uno scarso recupero della temperatura corporea dopo il parto, con conseguente peggiore condizione corporea in seguito ad un maggiore rifiuto dell'alimento; ciò ha inciso anche sull'eiezione del latte della scrofa, che si è tradotto in un minor peso allo svezzamento dei suinetti.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio preliminare hanno mostrato l'efficienza del meloxicam nel ridurre uno stato infiammatorio comunemente riscontrato nella scrofa in seguito al parto e dell'amoxicillina nel controllare la sintomatologia febbrile di origine respiratoria ad esso associata e hanno confermato di poter essere uno strumento efficiente per un approccio terapeutico completo. Ulteriori indagini a riguardo sono necessarie per confermare la validità statistica delle tendenze migliorative evidenziate.

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso-Spilsbury M., Mota-Rojas D., Villanueva-Garcìa D., Martìnez-Burnes J., Orozco H., Ramı´rez-Necoechea R., Lo´ pez M. A., Trujillo M. E. (2005) "Perinatal asphyxia pathophysiology in pig and human: a review". Animal Reproduction Science 90, 1–30
2. Anil S.S., Anil L., Deen J. (2008) "Analysis of periparturient risk factors affecting sow longevity in breeding herds". Canadian Journal of Animal Science 88, 381–389
3. Bonde M., Rousing T., Badsbergb 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". Livestock Production Science 87, 179–187.
4. Borges V. F., Bernardi M. L., Bortolozzo F. P., Wentz I. (2005) "Risk factors for stillbirth and foetal mummifications in four Brazilian swine herds". Prev. Vet. Med. 70, 165–176
5. Eissen J. J., Kanis E., Kemp B. (2000) "Sow factors affecting voluntary feed intake during lactation". Livest. Prod. Sci. 64, 147-165
6. Engelhardt G. (1996) "Pharmacology of meloxicam, a new non-steroidal antiinflammatory drug with an improved safety profile through preferential inhibition of COX-2". British Journal of Rheumatology 35, 4–12
7. Engelhardt G., Trummlitz G. (1990) "Biological activity of the main metabolites of meloxicam". Drugs Under Experimental Clinical Research 16, 53–56
8. Farm Animal Welfare Council (1992) "FAWC updates the five freedoms". The Veterinary Record 17, 357.
9. Friton G. M., Philipp H., Schneider T., Kleemann R. (2003) "Investigation on the clinical efficacy and safety of meloxicam (MetacamR) in the treatment of noninfectious locomotor disorders in pigs". Berliner und Mu¨ nchener Tiera¨ rztliche Wochenschrift 116, 421–426

10. Georgoulakis I. E., Petridou E., Filiousis G., Alexopoulos C., Kyriakis S. C., Papatsas I. (2006) "Meloxicam as adjunctive therapy in treatment and control of porcine respiratory disease complex in growing pigs". Journal of Swine Health and Production 14, 253–257.
11. Herskin M. S., Bonde M. K., Jørgensen E., Jensen K. H. (2011) "Decubital shoulder ulcers in sows: a review of classification, pain and welfare consequences". Animal 5:5, pp 757–766
12. Hirsch A. C., Philipp H., Kleemann R. (2003) "Investigation on the efficacy of meloxicam in sows with mastitis-metritis-agalactia syndrome". J Vet Pharmacol Ther, 26:355–60
13. Homedes J., Salichs M., Sabaté D., Sust M., Fabre R. (2014) "Effect of ketoprofen on pre-weaning piglet mortality on commercial farms". Vet J. 201:435–7
14. Hudson C., Whay H., Huxley J. (2008) "Recognition and management of pain in cattle". Farm Anim Pract, 30:126–34
15. Ison S. H., Jarvis S., Hall S. A., Ashworth C. J., Rutherford K. M. D. (2018) "Periparturient Behavior and Physiology: Further Insight Into the Farrowing Process for Primiparous and Multiparous Sows". Frontiers in Veterinary Science, volume 5, article 122.
16. Keita A., Pagot E., Prunier A., Guidarini C. (2010) "Pre-emptive meloxicam for postoperative analgesia in piglets undergoing surgical castration". Veterinary Anaesthesia and Analgesia 37, 367–374
17. Kemper N., Gerjets, I. (2009) "Bacteria in milk from anterior and posterior mammary glands in sows affected and unaffected by postpartum dysgalactia syndrome (PPDS)". Acta Veterinaria Scandinavica, 51, 26
18. Koketsu Y. (2005) "Six component intervals of nonproductive days by breeding-female pigs on commercial farms". J. Anim. Sci. 83, 1406-1412
19. Lucia Jr. T., Corrêa M. N., Deschamps J. C., Bianchi I., Donin M. A., Machado A. C., Meincke W., Matheus J. E. M. (2002) "Risk factors for stillbirths in two swine farms in the south of Brazil". Prev. Vet. Med. 53, 285–292
20. Maes D. G. D., Janssens G. P. J., Delputte P., Lammertyn A., de Kruif A., (2004) "Backfat measurements in sows from three commercial pig herds: Relationship with reproductive efficiency and correlation with visual body condition scores". Livestock Production Science 91, 57–67
21. Mainau E., Manteca X. (2011) "Pain and discomfort caused by parturition in cows and sows". Appl Anim Behav Sci. 135:241–51
22. Mainau1 E., Ruiz-de-la-Torre J. L., Dalmau A., Salleras J. M., Manteca X. (2012) "Effects of meloxicam (MetacamR) on post-farrowing sow behaviour and piglet performance". Animal, 6:3, pp 494–501
23. McGlone J. J., Nicholson R. I., Hellman J. M., Herzog D. N. (1993) "The development of pain in young pigs associated with castration and attempts to prevent castration-induced behavioral changes". Journal of Animal Science 71, 1441– 1446.
24. Melzack R. (1984) "The myth of painless childbirth (the John J. Bonica lecture)". Pain 19:321–37
25. Merskey H. (1979) "Pain terms: a list with definitions and a note on usage Recommended by the International Association for the Study of Pain (IASP). Subcommittee on Taxonomy". Pain 6, 249–252
26. Milliga B. N., Dewey C. E., De Grau A. F. (2002) "Neonatal-piglet weight variation and its relation to pre-weaning mortality and weight gain on commercial farms". Preventive Veterinary Medicine, 56, 119–127
27. Noakes D. E. (2001) "Parturition and the care of parturient animals". In: "Arthur's veterinary reproduction and obstetrics", ed. DE Noakes, TJ Parkinson and GCW England, pp. 155–187. WB Saunders, Philadelphia, USA

28. Osterlundh I., Hultén F., Johannisson A., Magnusson U. (2002) “Sows intramammarily inoculated with Escherichia coli at parturition: I. Functional capacity of granulocytes in sows affected or non-affected by clinical mastitis”. Veterinary Immunology and Immunopathology 90, 35–44
29. Papadopoulos G. A., Vanderhaeghe C., Janssens G. P. J., Dewulf J., Maes D. G. D. (2010) “Risk factors associated with postpartum dysgalactia syndrome in sows”. The Veterinary Journal, 184, 167–171
30. Peltoniemi O. A. T., Oliviero C. (2015) “Housing, management and environment during farrowing and early lactation”. In: Farmer C., editor. “The Gestating and Lactating Sow”. Wageningen: Academic Publishers. p. 231–52
31. Richards B. D., Black D. H., Christley R. M., Royal M. D., Smith R. F., Dobson H. (2009) “Effects of the administration of ketoprofen at parturition on the milk yield and fertility of Holstein-Friesian cattle”. Vet. Rec. 165, 102–106
32. Sabaté D., Salichs M., Bosch J., Ramó P., Homedes J. (2012) “Efficacy of ketoprofen in the reduction of pre-weaning piglet mortality associated with subclinical forms of post-partum dysgalactia syndrome in sows”. Pig J. 67:19–23
33. Short C. E. (1998) “Fundamentals of pain perception in animals”. Applied Animal Behaviour Science 59, 125–133
34. Škorjanc D., Hohler M., Brus M. (2008) “Effect of backfat loss during lactation on weaning-to-oestrus interval of sows at gonadotropin application” rch. Tierz., Dummerstorf 51, 6, 560-571
35. Sneddon L. U., Elwood R. W., Adamo S. A., Leach M. C. (2014) “Defining and assessing animal pain”. Anim Behav. 97:201–12
36. Tantasuparuk W., Dalin A. M., Lundeheim L., Kunavongkrit A., Einarsson S. (2001) “Bodyweight loss during lactation and its influence on weaning-to-service interval and ovulation rate in Landrace and Yorkshire sows in the tropical environment of Thailand”. Animal Reproduction Science 65, 273–281
37. Tummaruk P., Sang-Gassanee K. (2012) “Effect of farrowing duration, parity number and the type of anti-inflammatory drug on postparturient disorders in sows: a clinical study”. Trop Anim Health Prod. 45:1071–7
38. Valros A., Rundgren M., Špinka M., Saloniemi H., Rydhmer L., Hultén F., UvnäsMoberg K., Tománek M., Krejcí P., Algers B. (2003) “Metabolic state of the sow, nursing behavior and milk production”. Livestock Production Science 79, 155–167
39. Viitasaari E., Hänninen L., Heinonen M., Raekallio M., Orro T., Peltoniemi O., Valros A. (2013) “Effects of post-partum administration of ketoprofen on sow health and piglet growth”. The Veterinary Journal, vol. 198, no. 1, pp. 153-157
40. Viitasaari E., Raekallio M., Heinonen M., Valros A., Peltoniemi O., Hänninen L. (2014) “The effect of ketoprofen on post-partum behaviour in sows”. Appl Anim Behav Sci. 158:16–22
41. Weary D. M., Huzzey J. M., von Keyserlingk M. A. G. (2008). “Using behavior to predict and identify ill health in animals”. Journal of Animal Science 87, 770–777

EFFETTO DELLA SOMMINISTRAZIONE DI *SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII* SUL CONTENUTO DI IMMUNOGLOBULINE IGG NEL COLOSTRO DELLA SCROFA

EFFECT OF SOMMINISTRATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE VAR. BOULARDII* ON IMMUNOGLOBULIN IGG CONTENT ON SOW'S COLOSTRUM

ARANGO F.[1], BAZZOLI A.[2], BRAVO DE LAGUNA F.[3], SAORNIL D.[3]

[1]SPIN Colombia SAS, Bogotá, Colombia, [2]Lallemand Animal Nutrition, Italy, [3]Lallemand Animal Nutrition, France

Parole chiave: Colostro, immunoglobuline G, rifrattometro
***Key words*:** Colostrum, immunoglobulin G, refractometer

RIASSUNTO: Un totale di 123 scrofe provenienti da 4 differenti allevamenti colombiani, sono state selezionate per valutare l'effetto della somministrazione di un lievito vivo, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, sul contenuto di IgG nel colostro. A tale scopo le scrofe sono state divise in due gruppi in base al trattamento ricevuto: gruppo controllo, CON e gruppo trattato, LSB (CON + Levucell SB). Il colostro è stato prelevato dopo la nascita del primo suinetto, dal secondo al quarto capezzolo su entrambi i lati. Il contenuto di IgG colostrali è stato determinato attraverso la valutazione dei gradi °Bx grazie all'utilizzo di un rifrattometro.
Le scrofe alimentate con Levucell SB hanno avuto un livello di gradi °Bx significativamente maggiore, 26.30 vs. 23.55 (P=0,002), ricadendo mediamente nella categoria di colostro "ADEGUATO", mentre il gruppo CON ricadeva nella categoria "LIMITATO". Inoltre il gruppo LSB ha registrato percentuali più elevate di scrofe appartenenti alle categorie di colostro "MOLTO BUONO" e "ADEGUATO", mentre il gruppo CON aveva una percentuale maggiore di scrofe nelle categorie "LIMITATO" e "SCARSO".

ABSTRACT: 123 sows, coming from 4 different Colombian farms, were selected to evaluate the effect of the administration of a live yeast, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, on the content of IgG on colostrum. The sows were divided into two groups based on the treatment they received: control group, CON; and treated group, LSB (CON + Levucell SB). Colostrum was sampled from the birth of first piglet, from the second to the fourth nipple, on both sides. The IgG content was determined by Brix degrees, thanks to the use of refractometer.
The sows feed with Levucell SB had a significantly higher level of °Bx, 26,30 vs 23,55 (P=0,002), and globally were included on colostrum category "ADEQUATE", whereas the CON belonged to the category "BORDERLINE". Moreover, LSB group had a higher percentage of sows belonging to the categories "VERY GOOD" and "ADEQUATE", whereas the CON group sows percentage was higher on categories "BORDERLINE" and "POOR".

INTRODUZIONE

L'utilizzo di scrofe iperprolifiche nella produzione suina moderna ha aumentato l'incidenza di suinetti deboli e della mortalità pre svezzamento [1]. Uno dei maggiori determinanti della sopravvivenza dei suinetti è un rapido e adeguato consumo di colostro. Infatti i suinetti alla nascita hanno bassi livelli di riserve energetiche e un sistema immunitario immaturo e sono quindi quasi privi di difese. Il colostro è un liquido denso secreto dalla ghiandola mammaria in concomitanza dell'inizio del parto e rappresenta l'unica fonte di nutrienti per i suinetti neonati.

Oltre alla funzione energetico-nutrizionale, il colostro ha anche una funzione immunitaria [3]. Infatti il colostro è ricco di immunoglobuline, principalmente IgG e cellule immunitarie. Inoltre è responsabile del trasferimento dell'immunità passiva dalla madre al suinetto [2,6]. Nell'allevamento della scrofa iperprolifica, quindi, l'adozione di strategie nutrizionali e/o manageriali volte all'aumento della produzione di colostro e il contenuto di IgG colostrali nella scrofa, potrebbero essere di supporto a migliorare i tassi di sopravvivenza dei suinetti nelle prime settimane di vita. Ad esempio, la supplementazione delle madri con probiotici, grazie alla loro capacità di migliorare la risposta immunitari negli animali, si è già dimostrato efficace nel migliorare la qualità del colostro nella scrofa. Infatti, Guillou et al. (2012) hanno dimostrato come la supplementazione delle scrofe con il lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae boulardii* ha aumentato, nel colostro, la concentrazione di immunoglobuline G (IgG) del 21% e la concentrazione di Immunoglobuline A (IgA) del 18%.
L'obbiettivo di questa prova è quello di studiare l'effetto della supplementazione nelle scrofe del lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCMI-1079 (Levucell SB) sulla concentrazione di IgG nel colostro, valutato direttamente in azienda, mediante l'utilizzo di un rifrattometro.

MATERIALI E METODI

Un totale di 123 scrofe di genetica PIC, provenienti da 4 differenti allevamenti A, B, C e D hanno partecipato alla prova. Le scrofe sono state assegnate a due differenti trattamenti sperimentali in funzione del numero di parto: Controllo (CON) e LSB (CON + 1 x 10^6 UFC/kg di mangime). Le scrofe del gruppo LSB hanno ricevuto il trattamento con lievito vivo a partire da 30 giorni prima del parto.
L'allevamento A era caratterizzato da 500 scrofe a banda settimanale. In questo Allevamento sono state campionate 6 scrofe CON e 18 scrofe LSB. Nell'allevamento B, 550 scrofe a banda quadrisettimanale, sono state campionate 10 scrofe CON e 15 scrofe LSB. Nell'allevamento C, 300 scrofe a banda quadrisettimanale, sono state campionate 10 scrofe CON e 26 scrofe LSB. Infine dall'allevamento D, 1800 scrofe in banda settimanale, sono state campionate 17 scrofe CON e 21 scrofe LSB. La distribuzione delle scrofe per ordine di parto è mostrata in figura 1.
I campioni di colostro sono stati prelevati dopo la nascita del primo suinetto, ma sempre prima della nascita del decimo suinetto. Per ogni scrofa sono stati prelevati 4 cc di colostro. Il prelievo è stato effettuato dai capezzoli compresi tra il secondo e quarto, su entrambi lati. Il prelievo è stato effettuato a mano con l'ausilio di guanti per evitare la contaminazione dei campioni. In ogni allevamento, i campioni del trattamento CON sono stati prelevati per primi. Una volta completata l'integrazione con *Saccharomyces cerevisiae boulardii* si è proceduto al prelievo dei campioni del trattamento LSB. Le date di campionamento sono riportate in tabella 1.

Allevamento	CON	LSB
A	20/01/2017	04/05/2017
B	08/03/2017	20/10/2017
C	13/05/2017	08/07/2017
D	26/08/2017	27/10/2017

Tabella 1: Date di campionamento per ogni allevamento.
Table 1: *Sampling date for each farm.*

Per la misurazione delle IgG è stato utilizzato un rifrattometro MA871. Il rifrattometro è stato utilizzato rispettando i seguenti passi: 1) calibrazione dello strumento con acqua distillata; 2) evitata lettura con luce solare diretta e in presenza di eccessiva ventilazione; 3) riempimento della cella fino al bordo; 4) in caso di risultato con gradi Brix (°Bx) <20 o >35, la misurazione è stata ripetuta per evitare eventuali errori; 5) ad ogni misurazione il rifrattometro è stato pulito con un panno umido per eliminare i residui di grasso della misurazione precedente; 6) ogni 10 misurazioni lo strumento veniva ricalibrato con acqua distillata.

La scala Brix viene generalmente utilizzata per misurare il contenuto di solidi diluiti in un liquido ed è comunemente utilizzata per misurare il livello di zuccheri. La correlazione tra il contenuto di IgG e i gradi °Bx misurati con rifrattometro è stata validata da Hasan et al. (2016), e classificata secondo la tabella 2.
I dati raccolti sono stati analizzati con SPSS Statistics 24.0 (IBM), e sottoposti ad analisi di varianza per le seguenti variabili: allevamento, numero di parto e trattamento come effetto principale. L'unità sperimentale è stata la scrofa e la significatività è stata considerata per $P<0.05$.

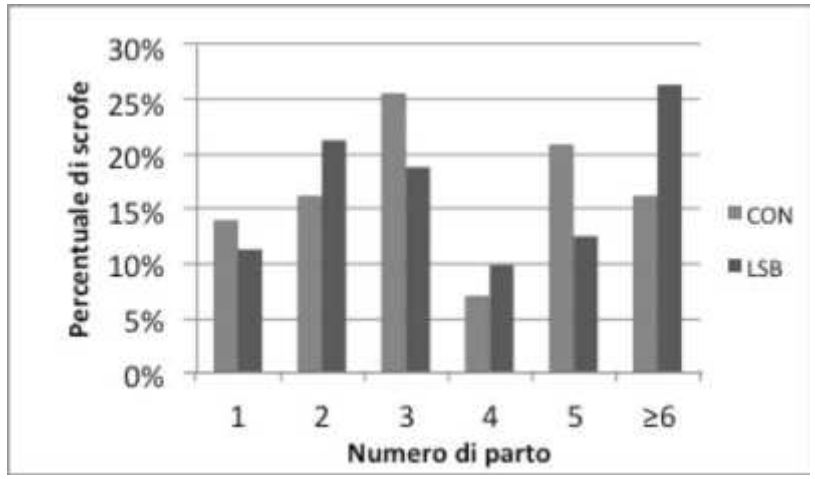


Figura 1: Distribuzione delle scrofe in funzione dell'ordine di parto.
Figure 1: *Distribution of sows according to parity order.*

Livello IgG	°Bx	**Contenuto IgG colostrali**
MOLTO BUONO	>30	78.6±8.4 mg/ml
ADEGUATO	25-29	50.7±2.1 mg/ml
LIMITATO	20-24	43.8±2.3 mg/ml
SCARSO	<20	14.5±1.8 mg/ml

°Bx: gradi Brix

Tabella 2: Correlazione tra gradi °Bx e contenuto di IgG colostrali.
Table 2: *Correlation between °Bx degree and IgG content on colostrum.*

RISULTATI
Sono state osservate differenze significative tra i due trattamenti (P=0.002) sulla media dei gradi °Bx. Le scrofe del gruppo LSB hanno mostrato un valore medio più elevato (23.55 vs. 26.30; tabella 3). La media delle misurazioni del gruppo CON ricadeva nella categoria di colostro "LIMITATO", mentre il gruppo LSB apparteneva alla categoria "ADEGUATO".

	CON	**LSB**	**Media**	**SEM***	**P**
°Brix	23.55 b	26.30 a	25.39	0.549	0.002

*SEM: errore standard medio

Tabella 3: Valore medio in Gradi Brix per trattamento. Il gruppo di scrofe che ha ricevuto Levucell SB ha avuto un livello significativamente maggiore di gradi °Bx.
Table 3: *Average °Bx value per treatment. The group of sows that received Levucell SB had a significant higher level of °Bx degree.*

Nella figura 2, per entrambi i trattamenti, sono stati rappresentati i risultati in percentuale classificati in base all'appartenenza a ciascuna categoria di colostro come descritto in tabella 2. Le scrofe appartenenti al gruppo LSB, hanno registrato una più alta percentuale di appartenenza alla categoria "MOLTO BUONO" e "ADEGUATO", mentre nelle categorie "LIMITATO" e "SCARSO" c'erano più scrofe del gruppo CON.

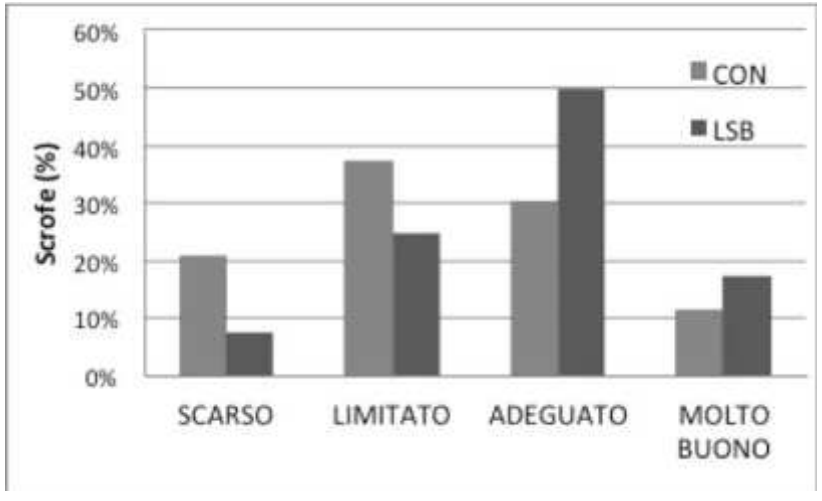


Figura 2: Distribuzione per categoria di colostro, in base al trattamento ricevuto dalle scrofe. Le scrofe del gruppo Levucell SB hanno registrato percentuali inferiori nelle categorie di colostro "Scarso" e "Limitato", mentre avevano una percentuale maggiore di animali con colostro "Adeguato" e "Molto buono".
Figure 2: *Distribution of sows according to colostrum category based on the treatment they received. The sows in Levucell SB group represent lower percentages in colostrum category "Poor" and "Borderline", whereas their percentage is higher in the categories "Adequate" and "Very good".*

Dall'analisi del numero di parto in base al trattamento ricevuto (figura 3), è possibile notare che per le scrofe primipare, come per le scrofe di sesto parto o superiore, il gruppo CON presentava una maggiore percentuale di scrofe all'interno della categoria "SCARSO" (la parte di colonna segnata in rosso), suggerendo un beneficio maggiore di *Saccharomyces cerevisiae boulardii* nelle scrofe più vulnerabili della mandria.

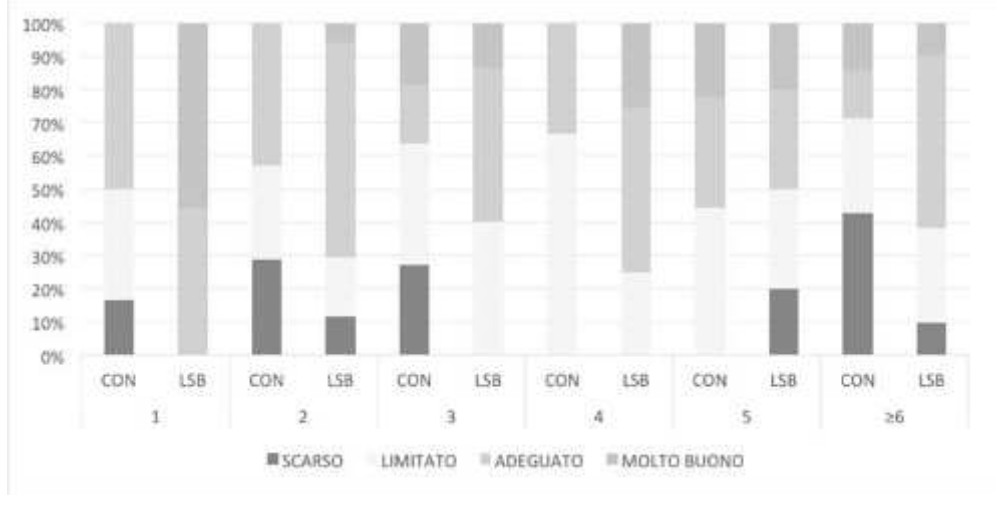


Figura 3: Percentuale di scrofe appartenenti a ciascuna categoria di qualità di colostro per ordine di parto in base al trattamento. Da osservare come le scrofe del gruppo controllo presentavano una percentuale maggiore di scrofe all'interno della categoria di colostro "Scarso". In particolar modo le scrofe di primo parto che hanno ricevuto Levucell SB in gestazione hanno mostrato la percentuale più elevata di colostro "Molto buono".
Figure 3: *Percentage of sows belonging to each category of colostrum quality according to parity order and treatment.*
It is to observe how the Control group sows presented a higher percentage of animals in colostrum category "Poor". Particularly the primiparous sows that received Levucell SB the last month of gestation shown the higher percentage of "Very good" colostrum.

Infine, osservando il livello di °Bx per ordine di parto, tabella 4, è stata osservata una tendenza ad un livello superiore di °Bx nel gruppo Levucell SB per le scrofe di primo, secondo e terzo, e corrispondenti in tutti e tre i casi alla categoria "Adeguato", mentre le scrofe CON appartenevano alla categoria "Limitato". Per le scrofe appartenenti agli altri ordini di parto, non sono state riscontrate differenze significative. E' da osservare come nelle scrofe primipare il beneficio della supplementazione di Levucell SB sia pari ad un valore di °Bx superiore del 20,6% rispetto alle primipare del gruppo CON.

Parto	CON	LSB	Valore P
1	*22.3 (Limitato)*	*26.6 (Adeguato)*	*0.056*
2	*21.8 (Limitato)*	*25.2 (Adeguato)*	*0.064*
3	*22.0 (Limitato)*	*25.4 (Adeguato)*	*0.080*
4	27.7 (Adeguato)	26.0 (Adeguato)	0.627
5	28.8 (Adeguato)	25.2 (Adeguato)	0.328
≥ 6	22.0 (Limitato)	25.6 (Adeguato)	0.141

Tabella 4: Livello medio di Gradi Brix (categoria) per numero di parto e per trattamento. Per le scrofe di primo, secondo e terzo parto del gruppo Levucell SB è stata osservata una tendenza ad un maggiore contenuto di °Bx rispetto al gruppo CON e di conseguenza un più elevato contenuto di IgG colostrali.
Table 4: *Average level of °BX according to parity order and treatment. First, second and third parity sows within Levucell SB group shown a tendency for a higher level of °Bx compared to the CON group, and accordingly a higher content of IgG on colostrum.*

CONCLUSIONI

I risultati della prova indicano che la supplementazione delle scrofe con il lievito vivo *Saccharomyces cerevisiae boulardii* a partire da 30 giorni prima della data prevista di parto è in grado di aumentare il contenuto di IgG nel colostro, e per tanto migliorare il potenziale trasferimento dell'immunità passiva dalla scrofa ai suinetti appena nati.

BIBLIOGRAFIA

1. Boulot S., Quesnel H., Quiniou N., (2008), "Management of high prolificacy in French herds: can we alleviate side effects on piglet survival?", Advances in Pork Production; 19:213-220
2. Budimir K., Čuljak V., Kušec G., Margeta V., (2014), "Preliminary results of chemical analysis of sow colostrum from first to ninth parity", Acta Agraria Kaposváriensis; Vol 18 Supplement 1, 173-179.
3. Farmer C., Devillers N., John A. Rooke J.A., Le Dividich J., (2006)," Colostrum production in swine: from the mammary glands to the piglets", Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources; 2006 1, No. 003
4. Guillou D., Chevaux E., Rosner D., Le Treut Y., Le Dividich J. (2012), "Feeding live Saccharomyces cerevisiae boulardii to sows increases immunoglobulin content in colostrum and milk.", Journèes de la Recherche Porcine; 44: 189-190
5. Hasan SM., Junnikkala S., Valros A., Peltoniemi O., Oliviero C., (2016), "Validation of Brix refractometer to estimate colostrum immunoglobulin G content and composition in the sow", Animal; 10: 1728-1733
6. Hurley WL. (2015), "*The gestating and lactating sow"*. Wageningen Academic Publishers

UTILIZZO DELLA VACCINAZIONE CONTRO LA SALMONELLA TYPHIMURIUM NEI SUINI: BREVE RASSEGNA BIBLIOGRAFICA

SCHÜLER V.

IDT Biologika, Dessau-Roßlau, Germania

Parole chiave: Salmonella, vaccinazione, rassegna
***Key words*:** Salmonella, vaccination, review

Sintesi: Questo articolo esamina in rassegna diverse pubblicazioni oggetto di valutazione "inter pares" sul tema dell'uso della vaccinazione per ridurre la presenza della Salmonella nei suini.

INTRODUZIONE

Nel 2001 l'Unione Europea ha introdotto il concetto "farm to fork" nella lotta contro le malattie di origine alimentare. L'idea nuova connessa al concetto "farm to fork " era che gli agenti patogeni zoonotici, provenienti da animali che causano malattie di origine alimentare non solo dovessero essere ridotti al macello, nelle aziende di trasformazione e distribuzione, ma anche a livello di allevamento, prestando più attenzione all'animale in vita. Il principale agente patogeno zoonotico di origine alimentare nella carne suina e nei prodotti a base di carne suina è la *Salmonella (S.*) Typhimurium. Per ridurre la presenza di questo agente patogeno nei suini nell'allevamento sono stati sperimentati numerosi metodi: modifica della composizione del mangime, aggiunta di vari acidi al mangime o all'acqua e protocolli igienici estesi miranti a migliorare la pulizia e la disinfezione dell'ambiente in cui vivono i suini. Numerosi articoli su queste strategie sono stati pubblicati nella letteratura scientifica. Una strategia di riduzione che ha ricevuto meno attenzione è certamente la vaccinazione. Il presente documento ha lo scopo di esaminare le pubblicazioni che riportano dati relativi all'adozione della vaccinazione in prove di campo al fine di ridurre la prevalenza di *S.* Typhimurium nei suini in allevamento.

MATERIALE E METODI

Il database utilizzato per l'analisi è stato PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/). Due ricerche sono state effettuate in data 25.01.2019. Le parole chiave utilizzate per la prima ricerca sono state: swine AND vaccination AND *Salmonella.* I parametri sono stati la ricerca nel titolo e nell'estratto di un documento. Le parole chiave utilizzate per la seconda ricerca sono state: pig AND vaccination AND *Salmonella.* Anche in questo caso i parametri sono stati la ricerca nel titolo e nell'estratto di un documento. La parola "pig" è stata usata come wildcard di ricerca, il che significa che non solo la parola "pig", ma anche 600 varianti di questa radice terminologica sono state ricercate. Sono stati inclusi tutti i documenti in inglese o in tedesco e dove il documento era ad accesso gratuito o a pagamento.

RISULTATI

La ricerca iniziale di PubMed con le parole chiave di cui sopra ha prodotto 29 articoli; la seconda ricerca ha prodotto 49 risultati. Dalla prima ricerca sono stati immediatamente esclusi 23 articoli; ciò è dovuto alla non rilevanza (n= 9), ad articoli che riportano solo test di laboratorio (n= 9), ad articoli che non trattano di *S.* Typhimurium (n= 4), infine un articolo è stato escluso in quanto non è risultato disponibile un estratto per poterne determinare la rilevanza. Altri quattro documenti sono stati esclusi, in quanto si trattava di revisioni e non hanno riportato il lavoro

originale sull'uso del vaccino in campo. Pertanto da questa ricerca sono rimasti due documenti da analizzare. La seconda ricerca con le varie parole chiave ha prodotto 49 risultati. Di questi, 40 documenti sono stati esclusi; ciò è dovuto alla non rilevanza (n= 22), a documenti che riportano solo test di laboratorio (n= 15) e a documenti che non trattano di *S.* Typhimurium (n= 3). Dai nove documenti rimanenti, altri quattro sono stati esclusi in quanto si trattava di revisioni, altri due documenti sono stati esclusi in quanto erano già apparsi nella ricerca precedente. Pertanto da questa ricerca sono rimasti tre documenti da includere nell'analisi. In totale sono stati analizzati cinque articoli per questa relazione.

Di questi cinque studi sul campo, due hanno avuto luogo nel Regno Unito, uno in Belgio, uno in Italia e uno in Germania. Il più datato risale al 2006, quello più recente al 2017. Tre hanno riportato di aver testato un vaccino vivo attenuato, mentre due pubblicazioni hanno descritto l'uso di un vaccino inattivato. In tre studi sono state vaccinate solo le scrofe, in un test sono state vaccinate le scrofe e i suinetti e in uno sono stati vaccinati solo i suinetti. Tutti e cinque hanno evidenziato il successo delle strategie di vaccinazione esaminate. La tabella 1 fornisce una panoramica dei documenti presi in esame:

Tabella 1: Confronto tra gli studi sul campo

Documento	Anno	Tipo di vaccino	Impostazione dello studio	Salmonellosi clinica	Schema di vaccinazione	Analisi
Roesler et al.	2006	Tipo inattivato (herd specific)	1 allevamento ,studio caso controllo all'interno del gruppo	Sì, nei soggetti all'ingrasso	Solo scrofe; 6x per via orale più 2x *i.m. ante partum*	Campioni fecali Campioni di sangue
De Ridder et al.	2014	Vivo attenuato	3 allevamenti, studio caso controllo all'interno del gruppo	Non segnalata	Solo suinetti, 2x per via orale, 3° giorno di vita e 24° giorno di vita.	Campioni fecali Campioni di organi, campioni di sangue
Ruggeri et al.	2015	Tipo inattivato (herd specific)	1 allevamento, studio caso controllo all'interno del gruppo	Sì, nei soggetti all'ingrasso	Scrofe: 2x *i.m. ante partum* Suinetti: 2x *i.m*. a 4 e 8 settimane	Campioni fecali, campioni di organi, campioni di sangue, peso corporeo suinetti
Davies et al.	2016	Vivo attenuato	5 allevamenti, prima e dopo a confronto	Sì, nei soggetti all'ingrasso	Scrofe: 2x *s.c. ante partum*	Campioni fecali, campioni ambientali
Smith et al.	2017	Vivo attenuato	16 allevamenti, confronto inter-gruppo	Sì, ma la fascia d'età non è stata specificata	Scrofe: 2x *s.c. ante partum*	Campioni fecali, campioni ambientali

im = intramuscolare; s.c. = sottocutaneo; ante partum = prima del parto

DISCUSSIONE

Le ricerche per questa rassegna si sono limitate a PubMed, che è una banca dati sviluppata e gestita dal National Center for Biotechnology Information (NCBI) della U.S. National Library of Medicine (NLM) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3827/#pubmedhelp.PubMed_Quick_Quick_Start). Si è deciso di utilizzare questo sito web come garanzia minima per la qualità e l'accessibilità degli studi esaminati. Il numero di studi da esaminare potrebbe essere ampliato utilizzando altre piattaforme scientifiche di riferimento che includono studi redatti anche in lingue diverse dall'inglese. Inoltre, in questa rassegna sarebbe interessante includere casi di studio che non siano stati pubblicati su riviste internazionali sottoposte a valutazione ma piuttosto su riviste veterinarie locali, anche se l'accesso a queste ultime potrebbe risultare difficile.

Il risultato comune di tutte le prove di campo analizzate è stato che il rispettivo schema di vaccinazione esaminato ha avuto successo rispetto all'ipotesi del test individuale. Si tratta di un pregiudizio che si riscontra spesso nelle pubblicazioni scientifiche (Wareham et al. 2017) e che rende difficile giungere a delle conclusioni sulla validità di una qualunque "invenzione". Tuttavia, è incoraggiante il fatto che vari programmi di vaccinazione con schemi diversi (scrofe e suinetti, solo scrofe o solo suinetti) siano giunti allo stesso risultato che la vaccinazione possa essere un metodo efficace per ridurre la *Salmonella* in allevamento. È interessante notare che due degli studi esaminati hanno testato un vaccino inattivato (herd specific), tenendo in considerazione che i vaccini inattivati contro la *Salmonella* sono spesso considerati meno efficaci rispetto ai vaccini vivi attenuati, poiché non inducono un'immunità cellulare (Ugolini et al. 2018).

Al fine di dimostrare il successo di un intervento, si ritiene sia una buona prassi scientifica includere un gruppo di controllo nello stesso periodo (Davies et al. 2017). Tre delle prove esaminate hanno incluso un gruppo di controllo intra-allevamento, mentre lo studio di Smith et al. ha confrontato i risultati con altri gruppi non sottoposti a vaccino (livello inter-mandria). Solo la pubblicazione di Davies et al. (2016) non ha incluso un gruppo di controllo, tuttavia ha messo a confronto i risultati dei cinque gruppi osservati prima e dopo la vaccinazione (studi longitudinali). Nonostante questo schema di studio sia comune per le prove di campo per la sua semplicità, il fatto che quattro prove abbiano incluso gruppi di controllo dimostra che è possibile farlo e dovrebbe quindi essere uno standard a cui mirare.

L'utilizzo di campioni fecali come parametro di efficacia è logico quando si tratta di un agente patogeno enterico come la *Salmonella*. Inoltre è un campione facile da raccogliere. Non sorprende quindi che tutti gli studi abbiano incluso questo tipo di campione. Campioni di organi prelevati al macello quali i linfonodi ileocaecali (de Ridder et al. 2014), le tonsille, i linfonodi e il contenuto del colon (Ruggeri et al. 2015) potrebbero fornire ulteriori informazioni preziose, tuttavia seguire i suinetti fino alla macellazione richiede un grande sforzo logistico. Per tre delle prove sul campo analizzate sono anche stati raccolti campioni di sangue per dimostrare l'effetto della vaccinazione sull'immunologia umorale Sfortunatamente, non sono state condotte analisi in alcuno dei cinque studi per quanto concerne la risposta immunitaria cellulare.

Un parametro che potrebbe avere un effetto considerevole sull'esito di uno studio è certamente la durata dell'intervento e la lunghezza del periodo di osservazione successivo. Tre delle prove analizzate (Roesler et al., de Ridder et al. e Ruggeri et al.) hanno riguardato la vaccinazione di un solo gruppo e poi hanno osservato o la progenie delle scrofe vaccinate o gli stessi suinetti vaccinati fino alla macellazione. Pertanto non è stato possibile trarre alcuna conclusione sugli effetti a lungo termine di questo intervento in allevamento. Gli studi di Davies et al. e Smith et al. hanno osservato gli allevamenti testati per un lasso di tempo più lungo (da uno a due anni), ma poiché solo le scrofe sono state vaccinate, non è stato possibile trarre conclusioni sull'effetto a lungo termine della vaccinazione delle scrofe e dei suinetti.

CONCLUSIONE

La vaccinazione contro *S.* Typhimurium è una misura efficace non solo per ridurre i segni clinici della Salmonellosi, ma anche per ridurre la presenza di *S.* Typhimurium in azienda. Sono tuttavia necessarie ulteriori indagini sugli effetti a lungo termine della vaccinazione delle scrofe e dei suinetti.

BIBLIOGRAFIA

1. Davies, R., Gosling R.J., Wales, A.D., Smith R.P. (2016): "Use of an attenuated live Salmonella Typhimurium vaccine on three breeding pig units: a longitudinal observational field study". Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 46, 7-15.
2. Davies, R. London, C., Lascelles, B., Conzemius, M. (2017): "Quality assurance and best research practices for non-regulated veterinary clinical trials". BMC Veterinary Research 13:242.
3. De Ridder, L., Maes, D., Dewulf, J., Butaye, P., Pasmans, F., Boyen, F., Haesebrouck, F., Van der Stede, Y. (2014):"Use of a live attenuated Salmonella enterica serovar Typhimurium vaccine on farrow-to-finish pig farms". Vet. J. 202, 303-308.
4. Roesler, U., Heller, P., Waldmann, K.H., Truyen, U., Hensel, A. (2006):"Immunization of sows in an integrated pig breeding herd using a homologus inactivated Salmonella vaccine decreases the prevalence of *Salmonella* Typhimurium infection in the offspring". J Vet Med B 53, 224-228.
5. Ruggeria J., Pesciaroli, M., Foresti, F., Giacomini, E., Lazzaro M., Ossiprandi, M.C., Corradi, A., Lombardi, G., Pasquali, P., Alborali, G.L. (2015): "Inactivated *Salmonella* enterica serovar Typhimurium monophasic variant (S. Typhimurium 1,4,[5],12:i-) in sows is effective to control infection in piglets under field condition". Vet Micro. 180, 82-89.
6. Smith, R.P., Andres, V., Martelli, F., Gosling, B., Marco-Jimenez, F., Vaughan K., Tchorzweska M., Davies, R. (2017): "Maternal vaccination as a *Salmonella* Typhimurium reduction strategy on pig farms". J. Appl. Micro. 124, 274-285.
7. Ugolini, M., Gerhard, J., Burkert, S. et al. (2018): "Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses". Nature Immunology https://doi.org/10.1038/s41590-018-0068-4
8. Wareham, K.J., Hyde, R.M., Grindlay, D., Brennan M.L., Dean, R.S. (2017): „Sponsorship bias and quality of randomised controlled trials in veterinary medicine". BMC Veterinary Research 13, 234.

IDENTIFICAZIONE E CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE DI ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS (APPV) IN SUINI E CINGHIALI NEL NORD ITALIA

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF ATYPICAL PORCINE PESTIVIRUS (APPV) IN SWINE AND WILD BOAR IN NORTH ITALY

SOZZI E., PARISIO G., FACCIN F., LELLI D., SALOGNI C., BARBIERI I., ALBORALI G.L., MORENO A., LAVAZZA A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia.

Parole chiave: Suino; APPV; caratterizzazione molecolare
Key words*:* Pig; APPV; molecular characterization

RIASSUNTO

Atypical porcine pestivirus (APPV) è stato recentemente riconosciuto nel genere Pestivirus all'interno della famiglia *Flaviviridae*. Questo nuovo pestivirus suino è stato descritto per la prima volta negli Stati Uniti nel 2015 dove è stato associato al tremore congenito (CT) di tipo A-II nei suinetti appena nati. Ricerche successive hanno dimostrato che APPV è ampiamente diffuso nei suini domestici in Europa e in Asia.
In questo studio, è stata condotta un'indagine virologica nel Nord Italia per rilevare la presenza di APPV mediante metodi biomolecolari. L'esame di 330 feti suini e 179 campioni di sangue di cinghiali ha consentito di identificare due ceppi di APPV in suini della regione Lombardia e tre ceppi in cinghiali selvatici delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna. Il sequenziamento nucleotidico di una parte della regione codificante NS3 ha mostrato un'elevata similarità con ceppi di APPV europei (Spagna, Germania e Italia) precedentemente identificati.

ABSTRACT

Atypical porcine pestivirus (APPV) is a newly recognized member of the *Flaviviridae* family. This novel porcine pestivirus was first described in the U.S. in 2015 where it has been associated with congenital tremor (CT) type A-II in new-born piglets. Subsequent studies have pointed that APPV is widely distributed in domestic pigs in Europe and Asia. In this study, a virological survey was performed in North Italy to investigate the presence of APPV by molecular methods. By testing 330 pig fetuses and 179 wild boar blood samples, two APPV strains were detected in pig herds from Lombardy region and three strains in wild boars in Lombardy and Emilia Romagna regions. The nucleotide sequencing of a part of the NS3 coding region showed high similarity to APPV European strains (Spanish, Germany and Italy) previously detected.

INTRODUZIONE

I Pestivirus sono virus a genoma ssRNA altamente variabile, appartenenti alla famiglia *Flaviviridae*. Recentemente, sulla base delle evidenze molecolari ed epidemiologiche, è stata proposta una revisione della tassonomia del genere Pestivirus, con l'aggiunta di sette specie, oltre alle quattro già esistenti, non più suddivise sulla base della specie bersaglio, ma indicandole con un una lettera progressiva. Pertanto, come riportato da Smith et al. (2017), in aggiunta alle quattro specie riconosciute, rinominate come Pestivirus A (virus della Diarrea Virale Bovina tipo 1, BVDV-1), B (virus della Diarrea Virale Bovina tipo 2, BVDV-2), C (virus della Peste Suina Classica, CSF) e D (virus della Border Disease, BDV), sono individuate ora altre sette

specie putative, che includono: Pestivirus E (Pronghorn pestivirus), Pestivirus F (Bungowannah virus), Pestivirus G (giraffe pestivirus), Pestivirus H (Hobi-like pestivirus), Pestivirus I (Aydin-like pestivirus), Pestivirus J (rat pestivirus) e Pestivirus K (atypical porcine pestivirus). Inoltre, sono stati descritti recentemente altri differenti pestivirus, identificati rispettivamente in pipistrelli (bat-derived pestivirus), pecore e capre (Tunisian sheep pestiviruses) e suini (Linda pestivirus), che potrebbero rappresentare tre ulteriori specie.
Limitatamente alla specie suina, oltre a CSFV (pestivirus C), sono ad oggi identificati altri tre pestivirus: il Bungowannah virus (BV - pestivirus F), scoperto in Australia nel 2003, il Linda virus scoperto recentemente in Austria ed i pestivirus suini atipici (APPV o pestivirus K).
Il Pestivirus F ha inizialmente causato disordini riproduttivi, morte fetale e morte improvvisa nei suinetti, con gravi danni e perdite economiche, ma in seguito non è più stato rilevato in altri luoghi (Kirkland et al., 2007). Il Linda virus, è stato descritto nel 2015 in Austria, anch'esso in associazione alla TC in suinetti. Tale identificazione è da ritenersi occasionale visto che non più stato riportato in altri studi, lasciando del tutto indefinita la sua diffusione geografica e la rilevanza clinica nei suini (Lamp et al., 2017).
Sicuramente più rilevante per frequenza di identificazione, riscontri clinici ed importanza economica è l'APPV. Virus appartenente al gruppo dei pestivirus K, identificato più volte in Nord America (Hause et al., 2015; Arruda et al., 2016) e in Europa (Postel et al., 2016; Beer et al., 2016; de Groof et al., 2016). Sebbene APPV sia stato più volte identificato in animali asintomatici, vi è una chiara evidenza che sia associato con la sindrome da tremore congenito di tipo A-II (TC A-II) dei suinetti (Arruda et al., 2016). Inoltre, i dati ad oggi disponibili porterebbero a considerare APPV come diffuso in tutto il mondo e presente in modo stabile da lungo tempo in popolazioni di suini domestici e selvatici (Hause et al., 2015; Mosena et al., 2017; Postel et al., 2017; Munoz-Gonzalez et al., 2017). Un importante ruolo epidemiologico come veicolo dell'infezione sembra possa essere svolto da suini clinicamente sani e dai cinghiali, anche se le segnalazioni in quest'ultimi sono limitate a Germania, Serbia e Spagna (Cagatay et al., 2018 Colom-Cadena et al., 2019). Rimangono da approfondire le conseguenze economiche derivanti da focolai di APPV, infatti, uno studio descrive perdite economiche dovute a un calo del 10% del numero di suinetti svezzati per scrofa (Schwarz et al., 2017).
In questo studio, viene descritta la presenza del genoma di APPV in feti suini e in cinghiali delle regioni Lombardia ed Emilia Romagna e la caratterizzazione genetica dei ceppi identificati.

MATERIALI E METODI

Suini

Nel periodo 2016-2018 sono stati esaminati n.330 feti suini conferiti presso la sezione diagnostica di Brescia dell'IZSLER e provenienti dalle aziende presenti sul territorio di competenza. In corso di necroscopia, sono stati prelevati da ciascun feto abortito campioni di organi (cervello, polmone, milza, fegato e rene), poi riuniti in un unico pool e omogeneizzati. Il surnatante di centrifugazione è stato analizzato per identificare eventuali cause infettive di aborto.
Le analisi batteriologiche e parassitologiche sono state condotte seguendo procedure di *routine* attualmente in uso presso la Sezione Diagnostica di Brescia.
Le analisi virologiche sono state condotte sia con metodiche *real-time* RT-PCR per ricerca di PRRSV, PCV-2, PPV, PCV-3 e pan-pestivirus (Hoffman et al., 2006), sia tramite inoculazione in colture cellulari sensibili per l'isolamento di virus suini (SKI, Marc e Mas). I monostrati cellulari inoculati sono stati osservati quotidianamente per 5-7 giorni al microscopio ottico rovesciato per la eventuale comparsa di effetto citopatico (ECP). Le colture cellulari sono state sub-coltivate fino al 2° passaggio quando venivano testate in ELISA sandwich per la presenza di Pestivirus e PRRS.

Limitatamente a quei campioni che all'esame diretto in *real-time* RT-PCR avevano fornito segnale di positività per APPV, la subcultura proseguiva fino al 5° passaggio, quando, anche in assenza di ECP venivano testate con real-time RT-PCR specifica per APPV.

Cinghiali

In totale sono stati esaminati n. 179 campioni di sangue di cinghiali abbattuti nel corso del 2017-2018 per prelievo venatorio ed esaminati nell'ambito del piano di monitoraggio della fauna selvatica della Lombardia e dell'Emilia Romagna. I campioni di siero sono stati esaminati per la ricerca di anticorpi nei confronti del virus della Malattia Vescicolare del suino (MVS), dell'Encefalomiocardite da Cardiovirus (EMCV), della glicoproteina E (gE) del virus della Malattia di Aujeszky (ADV), di pestivirus (BVD, BDV, PSC), del virus dell'Influenza suina tipo A sottotipi H1N1, H1N2, H3N2 e, infine, di *Brucella* spp. Le analisi sierologiche sono state condotte impiegando le metodiche attualmente in uso presso l'IZSLER.

Identificazione e caratterizzazione genomica di APPV

Per la ricerca del genoma virale di APPV, tutti i campioni, sia gli omogenati da pool di organi fetali sia i sieri di cinghiale, sono stati sottoposti a *screening* tramite tecnica *real-time* RT-PCR gene-NS5B (Schwarz *et al*., 2017).
I campioni risultati positivi a tale esame sono stati caratterizzati mediante sequenziamento Sanger, utilizzando una RT-PCR mirata all'amplificazione di un frammento della regione NS3. Le sequenze nucleotidiche sono state allineate utilizzando il metodo ClustalW e comparate con le sequenze presenti in GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizzando il software Lasergene v 10.0 (DNAStar, Madison, USA). L'albero filogenetico è stato costruito con il software MEGA6 (Tamura et al., 2013), utilizzando il metodo di Neighbor-Joining (NJ).

RISULTATI

Suini

Le analisi *real-time* RT-PCR gene-NS5B sui campioni di omogenati da pool di organi dei feti suini hanno identificato due (0,6%) campioni positivi, uno da un pool di tre feti suini provenienti da un'azienda situata nella provincia di Brescia e l'altro da un pool di due feti di un allevamento della provincia di Mantova (Fig.1). Ciò in assenza di altri rilievi in questi due pool di campioni sia all'esame autoptico, che non evidenziava lesioni macroscopiche interne in alcuno di questi feti, sia a seguito di indagini batteriologiche e parassitologiche. Inoltre, le indagini biomolecolari per PRRSV, PCV-2, PPV e pan-pestivirus avevano fornito tutte risultati negativi e solo la ricerca di PCV-3 tramite metodica *real-time* PCR era risultata positiva per il pool di feti dell'azienda ubicata nella provincia di Brescia.
Le sequenze ottenute, APPV-BS/341729/2017 e APPV-MN/212160/2016, clusterizzano con APPV precedentemente identificati in Europa. In particolare, l'albero filogenetico costruito sulla regione NS3 (Fig. 2) mostra che i ceppi identificati formano due gruppi distinti: il ceppo MN/212160/2016 risulta correlato con il ceppo 98/Sp06 identificato in Spagna nel 2006 con una omologia del 99.2% e con il ceppo tedesco Bavaria S5/9 identificato nel 2015 con una omologia del 96.8%, mentre la sequenza BS/341729/2017 forma un clade separato e strettamente correlato con due sequenze identificate in Italia in suini nel 2015, Italy-164 e Italy-181, con un range di similarità nucleotidica rispettivamente del 95.5% – 99.2%. Le sequenze ottenute, APPV-BS/341729/2017 e APPV-MN/212160/2016 mostrano una similarità nucleotidica del 92.5%.
Nonostante la positività al test di real-time RT-PCR, l'esame virologico degli organi di feti suini tramite inoculazione in colture cellulari, fino al 5° passaggio, ha sempre fornito esito negativo.

Cinghiali

Tutti i cinghiali esaminati in questo studio, inclusi quelli APPV-positivi, provenivano da prelievo venatorio ed erano d considerarsi sani sulla base del loro comportamento prima dell'abbattimento e della mancanza di lesioni all'esame ispettivo della carcassa. Dei 179 campioni di sangue di cinghiali esaminati, n.3 (1,67%), provenienti da diverse località, in Lombardia (n.1) e in Emilia Romagna (n.2) (Fig. 1), sono risultati positivi allo screening per APPV.

Analogamente ai ceppi identificati nei suini, anche i ceppi sequenziati dai cinghiali, APPV-WB-RN/262773/2018, APPV-WB-CR/264058/2018 e APPV-WB-FC/132781/2018, sono risultati suddivisi in due cluster distinti: il primo comprende i ceppi WB-RN/262773/2018 e WB-FC/132781/2018, la sequenza identificata nell'allevamento suino di Mantova (MN/212160/2016) con omologia del 95.6% - 96%, e, ovviamente, i ceppi precedentemente indicati e appartenenti allo stesso cluster (Bavaria S5/9 e Spain 98/Sp06), con i quali mostrano un range di omologia nucleotidica del 98% - 99.2%. Il secondo cluster comprende: i) il ceppo WB-CR/264058/2018 abbattuto a Cremona, ii) il APPV identificato nei suini a Brescia (BS/341729/2017) con omologia del 96,4%, iii) i ceppi suini italiani, Italy-164 e Italy-181, con una correlazione del 96,4% - 96%; iv) i ceppi identificati recentemente in Germania, nella Bassa Sassonia, nel 2016 con una similarità del 94,3%.

Per quanto riguarda le analisi sierologiche collaterali eseguite, per le patologie previste nell'ambito del piano di monitoraggio della fauna selvatica, sui campioni di sangue risultati positivi per APPV si segnala: esito negativo per APPV-WB-RN/262773/2018, positività per anticorpi anti-*Brucella* spp per APPV-WB-CR/264058/2018 e, positività anticorpale per anticorpi gE del virus della Malattia di Aujeszky per APPV-WB-FC/132781/2018.

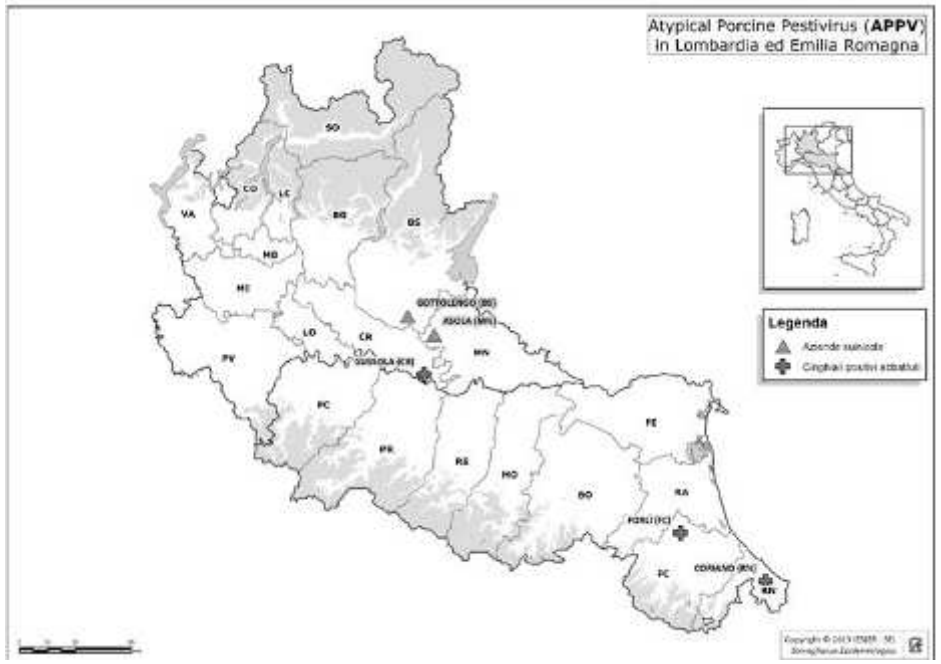


Figura 1: *Distribuzione geografica delle aziende suinicole e dei luoghi di abbattimento dei cinghiali con dimostrata identificazione di APPV.*

***Figure 1*: Geographical distribution of pig farms and wild boars hunting sites with APPV identification.**

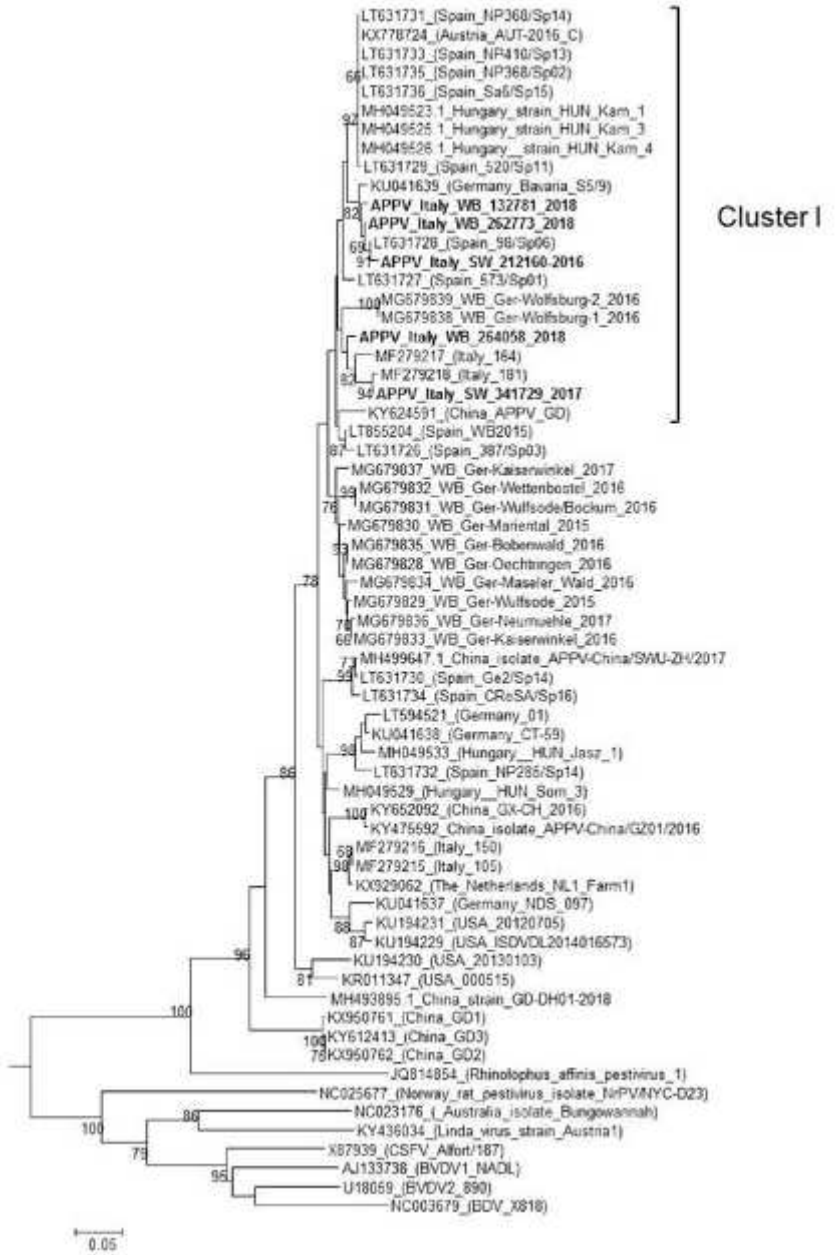


Figura 2: *Albero filogenetico costruito su una porzione di 645nt della regione NS3 di genomi APPV depositati in GenBank, mediante metodo Neighbor-Joining (NJ) utilizzando il software MEGA v.6.0. Sono mostrati valori di bootstrap > al 60% (in % su 1.000 replicati). In grassetto sono riportati i ceppi oggetto del presente lavoro.*

***Figure 2*: Phylogenetic tree based on a 645-nt fragment in the nonstructural protein 3 encoding region of APPV genome present in GenBank. Phylogenetic analysis by the neighbor-joining method including 1.000 iterations for bootstrap analysis was performed. Only bootstrap values ≥60 are indicated. Bold indicates sequences generated in this study.**

DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati ottenuti esaminando 330 feti suini e 179 campioni di sangue di cinghiali, abbattuti durante la stagione venatoria, ha permesso di identificare APPV nel territorio di competenza, rispettivamente due ceppi da feti suini e tre ceppi da sangue di cinghiali.

Sulla base dei risultati dell'analisi filogenetica eseguita, i ceppi sia di suini che di cinghiali sono correlati con ceppi precedentemente identificati in Spagna ed in Germania. Sebbene tutte le sequenze ottenute possano essere raggruppate nel putativo cluster I descritto da Muñoz-González et al. (2017), che comprenderebbe virus che avrebbero un'origine comune, i ceppi da noi identificati tendevano a disporsi in due sotto cluster distinti.

In apparenza, l'assenza di lesioni sia nei feti che nei cinghiali porterebbe ad escludere un ruolo patogenetico definito di APPV in questi casi specifici. Rimane tuttavia da chiarire se la co-infezione del virus PCV-3 con APPV, presente nel pool di feti dell'allevamento della provincia di Brescia, possa avere avuto un effetto sinergico nei suinetti infetti tale da determinare una forma clinica, caratterizzata da aborto, natimortalità od anche tremore congenito.

Come precedentemente segnalato, i cinghiali sono suscettibili all'infezione con APPV, ma il loro ruolo nell'epidemiologia del virus rimane sconosciuta. La bassa prevalenza di APPV nella popolazione di cinghiali da noi riscontrata ben si correla con quanto riportato da Colom-Cadena et al. (2019) in Spagna, ma è in contrasto con l'elevata prevalenza riportata nei cinghiali nel nord della Germania (Cagatay et al., 2018), dove APPV risulterebbe endemico nel cinghiale in molte regioni in Germania, e negli allevamenti di suini domestici (Hause et al., 2015; Postel et al., 2016; Beer et al., 2017; Muñoz-González et al., 2017).

La scarsa numerosità di ceppi isolati su un territorio geografico molto ampio, seppur tenendo conto delle omologie riscontrate fra alcuni ceppi che clusterizzano fra loro, non consente interpretazioni epidemiologiche sulle modalità di diffusione di APPV e sull'eventuale trasmissione tra il suino domestico e il cinghiale.

CONCLUSIONI

APPV appare ben stabilito nella popolazione suina domestica di differenti paesi in Europa, America ed Asia, dove studi retrospettivi hanno indicato il suo rilievo già da qualche decennio, sebbene sia stato possibile identificarlo solo negli ultimi anni con il progressivo affinamento delle tecniche diagnostiche.

Sulla scorta dei dati disponibili in letteratura di caratterizzazione genomica e di prevalenza nei suini domestici, APPV è quindi da considerare un virus ad elevata variabilità e molto diffuso. Questo studio sembrerebbe confermare la presenza e distribuzione di APPV anche nella popolazione di suini domestici e selvatici presenti nel territorio di competenza dell'IZSLER.

La maggior correlazione con ceppi identificati in Germania ed in Spagna rafforza l'ipotesi che i ceppi da noi identificati siano di origine europea, a conferma del probabile ruolo determinante correlato al commercio di suini tra diversi Paesi nella diffusione dell'infezione.

Il rilevamento di nuovi Pestivirus sottolinea la necessità di caratterizzare costantemente i ceppi circolanti per poter aggiornare i test diagnostici e avere una migliore comprensione dell'evoluzione di APPV, dell'epidemiologia e della prevalenza del virus.

RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano la Sig.ra Campagna Debora e la Sig. Zingarello Loredana per il prezioso contributo tecnico.

NOTE

Lavoro parzialmente finanziato dal Progetto di Ricerca Ministeriale 2015/019.

BIBLIOGRAFIA:

1. Arruda BL, Arruda PH, Magstadt DR, Schwartz KJ, Dohlman T, Schleining JA, Patterson AR, Visek CA, Victoria JG. Identification of a Divergent Lineage Porcine Pestivirus in Nursing Piglets with Congenital Tremors and Reproduction of Disease following Experimental Inoculation. PLoS One. 2016 Feb 24;11(2);e0150104.
2. Beer M, Wernike K, Dräger C, Höper D, Pohlmann A, Bergermann C, Schröder C, Klinkhammer S, Blome S, Hoffmann B. High Prevalence of Highly Variable Atypical Porcine Pestiviruses Found in Germany. Transbound Emerg Dis. 2017 Oct;64(5):e22-e26.
3. Cagatay GN, Antos A, Meyer D, Maistrelli C, Keuling O, Becher P, Postel A. Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). Transbound Emerg Dis. 2018 Aug;65(4):1087-1093.
4. Colom-Cadena Andreu, Llilianne Ganges, Sara Muñoz-González, Raquel Castillo-Contreras, José Alejandro Bohórquez, Rosa Rosell, Joaquim Segalés, Ignasi Marco and Oscar Cabezon. Atypical porcine pestivirus in wild boar (Sus scrofa), Spain. 2019 Vet Record in press de Groof A, Deijs M, Guelen L, van Grinsven L, van Os-Galdos L, Vogels W, Derks C, Cruijsen T, Geurts V, Vrijenhoek M, Suijskens J, van Doorn P, van Leengoed L, Schrier C, van der Hoek L. Atypical Porcine Pestivirus: A Possible Cause of Congenital Tremor Type A-II in Newborn Piglets. Viruses. 2016 Oct 4;8(10).
5. Hause BM, Collin EA, Peddireddi L, Yuan F, Chen Z, Hesse RA, Gauger PC, Clement T, Fang Y, Anderson G. Discovery of a novel putative atypical porcine pestivirus in pigs in the USA. J Gen Virol. 2015 Oct;96(10):2994-8.
6. Hoffmann B, Depner K, Schirrmeier H, Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestiviruses. Journal of Virological Methods. 2006;136:200–209
7. Kirkland PD, Frost MJ, Finlaison DS, King KR, Ridpath JF, Gu X. Identification of a novel virus in pigs--Bungowannah virus: a possible new species of pestivirus. Virus Res. 2007 Oct;129(1):26-34.
8. Lamp B, Schwarz L, Högler S, Riedel C, Sinn L, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rümenapf T. Novel Pestivirus Species in Pigs, Austria, 2015. Emerg Infect Dis. 2017 Jul;23(7):1176-1179.
9. Mósena ACS, Weber MN, da Cruz RAS, Cibulski SP, da Silva MS, Puhl DE, Hammerschmitt ME, Takeuti KL, Driemeier D, de Barcellos DESN, Canal CW. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) in Brazilian pigs. Transbound Emerg Dis. 2018 Feb;65(1):22-26.
10. Muñoz-González S, Canturri A, Pérez-Simó M, Bohórquez JA, Rosell R, Cabezón O, Segalés J, Domingo M, Ganges L. First report of the novel atypical porcine pestivirus in Spain and a retrospective study. Transbound Emerg Dis. 2017 Dec;64(6):1645-1649.
11. Postel A, Hansmann F, Baechlein C, Fischer N, Alawi M, Grundhoff A, Derking S, Tenhündfeld J, Pfankuche VM, Herder V, Baumgärtner W, Wendt M, Becher P. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. Sci Rep. 2016 Jun 13;6:27735.
12. Postel A, Meyer D, Cagatay GN, Feliziani F, De Mia GM, Fischer N, Grundhoff A, Milićević V, Deng MC, Chang CY, Qiu HJ, Sun Y, Wendt M, Becher P. High

Abundance and Genetic Variability of Atypical Porcine Pestivirus in Pigs from Europe and Asia. Emerg Infect Dis. 2017 Dec;23(12):2104-2107.
13. Schwarz L, Riedel C, Högler S, Sinn LJ, Voglmayr T, Wöchtl B, Dinhopl N, Rebel-Bauder B, Weissenböck H, Ladinig A, Rümenapf T, Lamp B. Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence. Vet Res. 2017 Jan 6;48(1):1.
14. Smith DB, Meyers G, Bukh J, Gould EA, Monath T, Scott Muerhoff A, Pletnev A, Rico-Hesse R, Stapleton JT, Simmonds P, Becher P. 2017. Proposed revision to the taxonomy of the genus Pestivirus, family Flaviviridae. J Gen Virol. 98(8):2106-2112
15. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30, 2725–2729.

NOROVIRUS GII IN FECI DI SUINI ALLEVATI NEL NORD ITALIA: IDENTIFICAZIONE DI DUE DIVERSI GENOTIPI

GII NOROVIRUS IN SWINE FAECAL SAMPLES IN NORTHERN ITALY: IDENTIFICATION OF TWO DIFFERENT GENOTYPES

CAVICCHIO L.[1], RIZZO G.[1], CUNIAL G.[1], MILANI A. [1], LACONI A.[1], CAMPALTO M.[1], PAGLIARI M. [1], USTULIN M.[1], MONNE I.[1], FORZAN M.[2], 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. I NoVs, appartenenti alla famiglia dei *Caliciviridae*, sono classificati in 7 genogruppi (G), da GI a GVII, suddivisi in 40 genotipi. I NoVs umani associati a gastroenterite appartengono ai genogruppi GI, GII e GIV. I NoVs sono stati riscontrati in diverse specie animali, inclusi i suini risultati positivi per GII. L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, ha condotto un progetto di ricerca con lo scopo di indagare la presenza di NoVs nelle feci di suini allevati nelle regioni di competenza e di studiarne le caratteristiche geniche. I dati presentati si riferiscono alle indagini condotte tra il 2017 e il 2019, per investigare la presenza e circolazione di NoVs nella popolazione suinicola del Veneto e Friuli Venezia Giulia (FVG). Dal campionamento di feci eseguito, al macello e in allevamento, è stato possibile identificare NoVs GII.11 e GII.18. Ad oggi questa rappresenta la prima segnalazione del genotipo GII.18 in Italia e in Europa.

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 seven genogroups (G), from GI to GVII, which are further subdivided into 40 genotypes. NoVs identified in human gastroenteritis cases are: GI, GII and GIV. NoVs have also been isolated from several animal species, including pigs which resulted positive for GII. The Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie conducted a research project that aimed to investigate the presence of NoVs in swine faeces collected in the competence area and to study their genetic characteristics. The present work describes the results of the project conducted between 2017 and 2019, based on a cognitive survey on the presence of NoVs in the swine population of Veneto and Friuli Venezia Giulia (FVG). Based on the sampling scheme adopted, it was possible to identify NoV GII.11 and GII.18: to date this is the first case of GII.18 reported in Italy and Europe.

INTRODUZIONE
I Norovirus (NoVs) sono causa di oltre il 90% di gastroenteriti virali nell'uomo a livello globale [1]. La trasmissione di questi piccoli virus (25-35nm), avviene 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]. L'eliminazione fecale di NoV, avviene prima della manifestazione clinica, e in maniera prolungata, aumentando nella popolazione il rischio di infezione e re-infezione. Inoltre il virus è molto resistente nell'ambiente esterno e presenta una bassa dose infettante diffondendosi velocemente in ambienti chiusi e con alta presenza di persone [3].

I virus del genere Norovirus appartengono alla famiglia *Caliciviridae* che a sua volta comprende i generi Sapovirus, Lagovirus, Nebovirus e Vesivirus. I NoVs presentano un genoma a RNA a singolo filamento a polarità positiva (ssRNA+), di 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, la proteina maggiore del capside Viral Protein 1-VP1 (ORF2) e la proteina minore del capside VP2 (ORF3) [4]. Sono classificati in sette genogruppi (GI – GVII) in base alla composizione amminoacidica della proteina VP1, coinvolta nei meccanismi di interazione recettoriale e specificità di legame virus-cellula ospite [5]. Sono stati identificati oltre 40 diversi genotipi all'interno dei 7 genogruppi. L'alto tasso di mutazione e la ricombinazione genica, che nei NoVs avviene frequentemente in una regione *hotspot* a livello della giunzione ORF1/ORF2 mediante un meccanismo simile al crossing-over, rendono la classificazione di questi virus a volte complessa. 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 [7]. In particolare, il genotipo 4 del genogruppo II (GII.4) è responsabile di circa l'85% degli episodi epidemici di gastroenterite nell'uomo [1]. Il genotipo umano NoV GII.4 è stato identificato in feci di suino, dimostrando come tale genogruppo possa infettare uomo e ospite animale anche in condizioni naturali, sia in prodotti di carne suina, suggerendo una possibile trasmissione zoonosica attraverso la catena alimentare [8]. Tali evidenze sperimentali hanno posto l'attenzione sul potenziale zoonosico dei NoVs e sul ruolo del suino nell'epidemiologia di questa complessa infezione.

I NoVs appartenenti ai genogruppi: GII.11, GII.18, GII.19, sono identificati in feci di suino [9] asintomatici [10] e non [11].

Attualmente sono limitati i dati in letteratura sulla presenza in Italia di NoVs nel serbatoio animale, quale il suino: l'unico caso descritto è relativo a un NoVs GII.11, identificato in feci di suino, in assenza di sintomatologia gastroenterica [12].

Il presente lavoro descrive i risultati del progetto di ricerca condotto tra il 2017 e il 2019, basati su una indagine conoscitiva sulla presenza di NoVs nella popolazione suina del Veneto e Friuli Venezia Giulia.

MATERIALI E METODI

La presenza di NoVs nella popolazione suina del Nord Est Italia è stata indagata tramite campionamenti di feci al macello ed in allevamento. In assenza di dati bibliografici relativi alla prevalenza inter-aziendale, la numerosità campionaria minima necessaria per la stima della prevalenza di NoVs 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 in Veneto e Friuli Venezia Giulia (FVG). Il numero complessivo delle aziende da ingrasso, attive al 31/12/2016, era pari a 396 per il FVG 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. Sulla base di tali considerazioni è stato pianificato un campionamento nel corso del 2017 condotto al macello sia in Veneto che FVG, come prima indagine conoscitiva. In base ai dati ottenuti dai campionamenti al macello

eseguiti nel 2017, i campionamenti a partire dal 2018 sono stati effettuati in allevamento nella sola regione del Veneto.

In totale sono stati prelevati e analizzati campioni provenienti da 148 allevamenti, 82 nel 2017, 68 nel 2018 e 4 nel 2019. In totale sono stati raccolti 305 campioni di feci, di cui 85 raccolti nel 2017 e 208 nel 2018 e 12 nel 2019. Inoltre sono stati analizzati 24 intestini di suino, di cui 17 provenienti da allevamenti del Friuli Venezia Giulia e 7 del Veneto, prelevati da suini con quadro di patologia gastroenterica all'esame autoptico nell'anno 2017. Le province coinvolte nel campionamento, sia in allevamento sia al macello, sono state in totale 10 di cui 7 nel Veneto (Belluno, Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona, Vicenza) e, 3 nel Friuli Venezia Giulia (Gorizia, Pordenone, Udine). Nel 2017, i campionamenti al macello sono stati effettuati per tutte le province in esame. Nel 2018, i campionamenti in allevamento sono stati eseguiti nelle province di Padova, Rovigo, Treviso, Venezia, Verona e Vicenza, nel 2019 nella provincia di Verona. Le categorie di animali campionati sono state le seguenti: scrofe e scrofette in box, scrofe in gabbia o sala parto, suinetti/suini da ingrasso fino a 150 gg, suini da ingrasso con un'età superiore ai 150 gg e verri.

Il campionamento effettuato nel 2017 è stato svolto in sede di macellazione presso stabilimenti regionali selezionati in base al numero di aziende conferenti capi provenienti dal territorio coinvolto nel progetto. Le feci sono state raccolte in pool da 5 individui per azienda. A partire dal 2018, ad esclusione di 18 campioni prelevati in singolo al macello, il campionamento è stato effettuato in allevamento. Sono stati prelevati pool costituiti da diversi campioni in base alla categoria di animale presente: nel caso di animali campionabili singolarmente, come per le scrofe in sala parto e scrofe in gabbia, il pool era rappresentativo di 5 capi, mentre per i verri di 2 capi. Nel caso invece di animali allevati in box, il pool era costituito da più campioni prelevati nell'ambito di diversi box (dai 12 ai 16 campioni in 3-4 box). Da Ottobre 2018 a Gennaio 2019 i pool sono stati prelevati in allevamenti sia da ingrasso sia in riproduzioni a ciclo chiuso su soggetti da ingrasso di età superiore ai 90 giorni.

I campioni di intestino sono stati omogenati utilizzando 20-40mg di tessuto e 0,5ml di MEM (Minimal Essential Medium, Sigma Aldrich) addizionato con 1% di PenStrep (10000 Ul/ml di Penicillina G, 100mg/ml di Streptomicina), mediante Tissue Lyser (Qiagen). L'RNA è stato estratto con il kit commerciale "High Pure RNA Tissue kit" (Roche Life Science). 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 14000x*g* 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.

Al fine di non escludere nell'analisi molecolare alcuna variante di NoVs animale, è stata applicata una metodica molecolare (RT-PCR), di screening, in grado di identificare tutti i generi virali della famiglia *Caliciviridae*. Per confermare un eventuale campione positivo per NoVs, si è reso necessario il sequenziamento del prodotto di PCR ottenuto. Tale PCR utilizza la coppia dei primers "p290-p110" [13], aventi come target un frammento di 300 paia di basi (bp) del gene codificante per l'RdRp. La fase di amplificazione dei cDNA è stata condotta con il kit "GoTaq G2 Flexi" (Promega).

Le feci campionate nel 2017 sono state analizzate mediante una RT-PCR due steps utilizzando random primers per la fase di retrotrascrizione (RT) seguendo le istruzioni d'uso riportate nel kit "SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR" (Invitrogen). A seguito di una fase di ottimizzazione della RT-PCR, le feci campionate dal 2018 in poi sono state analizzate con una metodica one step RT-PCR, utilizzato il kit "SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq DNA Polymerase" (Invitrogen) e la coppia di primers "p290-p110" [13].

I prodotti di PCR sono stati in seguito visualizzati su gel di acrilamide al 7%, colorato mediante

impregnazione argentica. Gli amplificati dei campioni risultati positivi mediante RT-PCR, che hanno mostrato su gel una banda idonea in termini di dimensioni e quantità dell'amplificato, sono stati sequenziati mediante metodo Sanger. Le sequenze ottenute del gene RdRp, (300 bp), sono state confrontate con quelle attualmente disponibili in GenBank usando il software BLAST. Con un approccio di primer walking disegnando dei primers *ad hoc* a partire dalla sequenza RdRp e utilizzando il primer VN3T20 [9] è stato sequenziato il gene VP1. E' stata eseguita l'analisi filogenetica dei NoVs identificati dal 2017 fino a Giugno 2018, utilizzando le sequenze nucleotidiche di 300 bp ottenute del gene RdRp e del gene VP1. Al fine di ottenere maggiori informazioni sulle caratteristiche genetiche dei NoVs identificati, sono stati disegnati dei primers per ottenere sequenze di lunghezza superiore ai 300 bp del gene RdRp, utilizzando la taq "OneStep Superscript III Reverse Transcriptase-Platinum Taq High Fidelity kit" (Invitrogen). Le sequenze ottenute sono state allineate usando il software MAFFT. Per le sequenze del gene RdRp, l'albero filogenetico è stato costruito con il metodo Maximum Likelihood (ML) utilizzando il software PhyML 3.1 con analisi di bootstrap con 1000 repliche e con il modello Kimura 2 (K2P) di sostituzione nucleotidica. Per la sequenza di VP1 è stato utilizzato il modello di sostituzione nucleotidica SYM + R4, con 100 repliche di bootstrap.

RISULTATI

Sono stati analizzati in totale 329 campioni di cui 305 feci e 24 intestini. Sessantuno campioni sono risultati positivi per *Caliciviridae* di cui 60 feci e 1 intestino (Tabella 1).

La positività per la RT-PCR si è basata sulla visualizzazione di un amplificato del gene RdRp di circa 300 bp. L'analisi di sequenza del frammento di 300 bp del gene RdRp dei 60 campioni di feci positive per *Caliciviridae* ha dato il seguente esito: 26 campioni positivi per Norovirus, 19 feci per Sapovirus, 15 campioni non analizzabili a causa di un amplificato non idoneo al sequenziamento. Un campione di intestino su 24 è risultato positivo per Sapovirus (Tabella 1).

I campioni di feci risultati positivi per *Caliciviridae* provengono tutti dalla regione Veneto e il campione di intestino positivo per Sapovirus proviene dal Friuli Venezia Giulia (Udine). La maggior parte dei campioni positivi per NoVs (23/26) sono stati identificati nel 2018, con un maggior numero di casi nella provincia di Treviso (Tabella 2).

I campioni di feci positivi per *Caliciviridae* (26 NoVs e 19 Sapovirus) sono stati identificati in Veneto e non in FVG, e provengono da aziende zootecniche situate nella provincia di Padova (10 campioni), Verona (14 campioni), Treviso (16 campioni), Vicenza (4 campioni), e Rovigo (1 campione) (Tabella 2). L'analisi filogenetica del frammento di 300 pb del gene RdRp dei campioni identificati in Veneto, ha evidenziato l'appartenenza di 22 campioni su 26 positivi NoVs al genotipo GII.11 e 4 al GII.18 (Tabella 2). I NoVs GII.11 sono stati identificati nel 2017 (2), nel 2018 (19) e nel 2019 (1), i NoVs GII.18 sono stati identificati nel 2018. I campioni positivi per GII.11 sono stati prelevati nelle province di Padova, Treviso, Verona, Vicenza e Rovigo, prevalentemente in suini da ingrasso. I positivi per GII.18 sono stati identificati nelle province di Padova e Treviso in suini da ingrasso, di questi, due sono stati prelevati nello stesso allevamento (Tabella 2).

L'analisi filogenetica condotta per il gene RdRp evidenzia che i NoVs GII.11 si dividono in due piccoli gruppi, un primo gruppo simile a ceppi riscontrati in Olanda nel 2009, un secondo gruppo costituito da soli campioni italiani. I NoVs GII.18 sono correlati a NoVs identificati in Canada nel 2009, U.S.A. nel 2004 e Brasile nel 2007. Inoltre è stata ottenuta con metodo Sanger, la sequenza completa di VP1 di un solo campione positivo per NoV GII.11 identificato nel 2017. L'analisi filogenetica di questa sequenza conferma l'appartenenza del ceppo al genotipo GII.11, e risulta correlata a NoVs identificati in Giappone nel 1997 e in Sud Corea nel 2007. I campioni positivi per NoVs (26) sono stati sottoposti a sequenziamento di una porzione maggiore del gene RdRp, ottenendo 14 sequenze di circa 800 pb, per le quali è in corso l'analisi filogenetica.

DISCUSSIONE

I dati riportati in questo studio indicano la presenza di NoVs nella popolazione suina presente in Veneto con circolazione di due diversi genotipi GII (GII.11 e GII.18). Il campionamento eseguito nell'ambito del presente studio, ha identificato per la prima volta la circolazione del GII.18 in suini in Italia e Europa. La differente distribuzione dei positivi tra le due regioni nel 2018, potrebbe essere associata alla differente modalità di campionamento, ovvero in allevamento (Veneto) o al macello (Veneto e FVG) e anche alla differente classe di età dei soggetti campionati (nel 2018 sono stati campionati suini dai 30 gg ai 9 mesi). Inoltre è da notare che l'aumento del numero di positività nel 2018 corrisponde all'identificazione di un diverso genotipo ovvero il GII.18. Tale dato indica l'importanza di una appropriato campionamento, al fine di individuare la presenza di NoVs e tracciarne la diversità genetica. Alla luce dei risultati ottenuti, la presenza di NoVs nella popolazione suina del nord-est italiano è stata rilevata principalmente nei suini all'ingrasso, tuttavia tale dato dovrebbe essere confermato da ulteriori indagini. La scarsità di dati e sequenze disponibili in database pubblici sui NoVs nella popolazione suina Italiana ed Europea, limitano la comprensione sulla diffusione di questi virus in particolare dei NoVs GII e la formulazione di ipotesi sulla loro origine ed evoluzione.

La maggior parte delle sequenze di NoVs disponibili in GenBank sono relative ad un frammento di 300 bp del gene RdRp e per la comparabilità dei dati, l'analisi filogenetica del presente studio è stata eseguita utilizzando lo stesso frammento del gene RdRp. Tuttavia per una migliore caratterizzazione di questi virus è importante poter disporre di maggiori informazioni genetiche, in particolare quella del gene VP1, codificante una proteina capsidica a cui sono associate le principali caratteristiche antigeniche del virus.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro dimostra la co-circolazione di due differenti genotipi di NoVs nella popolazione suina del Nord-Est, la cui diffusione andrebbe monitorata nel tempo al fine di comprenderne i meccanismi evolutivi e di trasmissione inter-specie. Le generazione di sequenze di NoVs suini costituisce un importante contributo per comprendere l'evoluzione di questi virus e per studiarne i meccanismi di trasmissione inter-specie. Tuttavia rimangono delle domande aperte riguardo l'epidemiologia di tale infezione, il ruolo dei suini nella trasmissione e nel mantenimento di NoVs GII e il potenziale zoonotico di NoVs del suino.

RINGRAZIAMENTI

Il presente studio è stato finanziato dal Ministero della Salute (IZSVE RC12/15). Un particolare ringraziamento è rivolto ai veterinari libero professionisti e non che hanno collaborato durante i campionamenti ed in particolare il: Dott.Daniele Boffo, Dott. Stefano Adami e Dott. Fabrizio Cestaro.

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. Vinjé J1. (2015) "Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus" J Clin Microbiol. 53(2):373-81.
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. Ramani S1, Atmar RL, Estes MK. (2014) Epidemiology of human noroviruses and updates on vaccine development. Curr Opin Gastroenterol. 30(1):25-33.
8. 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.
9. 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.
10. Machnowska P., Ellerbroek L., Johne R. (2014) "Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany" Vet Microbiol 168:60-8.
11. 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.
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 evalution of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR" J Virol Methods 83:145-154.

Tabella 1. Risultati ottenuti mediante end point RT-PCR e sequenziamento suddivisi per tipologia di matrice.
Table 1. Results obtained by endpoint RT-PCR and sequencing according to the type of the original sample matrix.

	Positivi Calicivirus			Negativi
	Norovirus	**Sapovirus**	**Non sequenziabili**	
Feci	26	19	15	245
Intestini	0	1	0	23
Totale	26	20	15	268

Tabella 2. Origine e anno di campionamento dei positivi Norovirus e Sapovirus.
Table 2. Province of origin and sampling year of the Norovirus and Sapovirus positive samples.

	Norovirus			Sapovirus			
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	Totale
Padova*	1	4	0	0	5	0	10
Rovigo	0	1	0	0	0	0	1
Treviso*	0	11	0	0	5	0	16
Vicenza	0	4	0	0	0	0	4
Verona	1	3	1	1	7	1	14
Udine	0	0	0	1	0	0	1
Totale	2	23	1	2	17	1	46

*Province in cui è stato individuato NoVs GII.18, i rimanenti campioni positivi per NoV sono stati classificati come GII.11.
*Provinces in which was identified NoVs GII.18, the remaining NoVs positive samples were classified as GII.11.

Figura 1. Albero filogenetico, costruito con metodo ML e modello di sostituzione nucleotidica, K2P di un frammento del gene RdRp di 300 bp. Le sequenze dei NoV suini italiani identificati in questo studio (mostrati in rosso) sono stati allineati con le sequenze di riferimento RdRp di NoV umani e suini disponibili in GenBank.
Figure 1. Phylogenetic tree, constructed with ML method and K2P model of nucleotide substitution, of a 300bp RdRp gene fragment. Sequences of Italian swine NoVs identified in this study (shown in red) aligned with the RdRp reference sequences of human and swine NoVs available in GenBank.

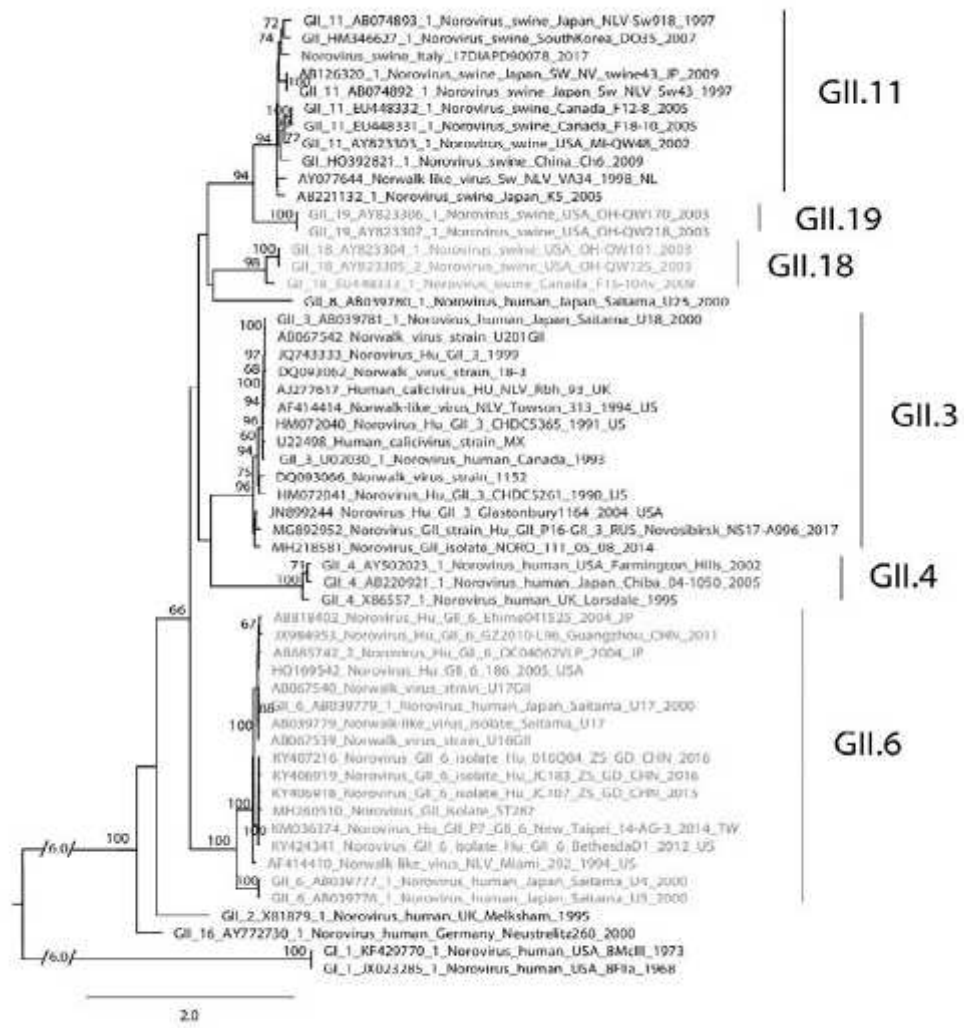


Figura 2. Albero filogenetico, costruito con metodo ML e modello di sostituzione nucleotidica SYM + R4 di un frammento di gene VP1 di 1700bp. La sequenza VP1 di NoV suino italiana identificata in questo studio (mostrata in rosso) è allineata con le sequenze di riferimento VP1 di NoV umani e suini disponibili in GenBank.
Figure 2. Phylogenetic tree, constructed with ML method and SYM+R4 model of nucleotide substitution, of a 1700bp VP1 gene fragment. VP1 sequence of Italian swine NoVs identified in this study (shown in red) was aligned with the VP1 reference sequences of human and swine NoVs available in GenBank.

DIFFUSIONE DI ROTAVIRUS A E NON-A IN SUINETTI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA

WIDESPREAD OF ROTAVIRUS A AND NON-A IN PIGLETS WITH ENTERITIS

FERRARI E.[1], BUSI C.[1], SALOGNI C.[1], MARTELLA V.[2], GIOVANNINI S.[1], ALBORALI G.L.[1], BONIOTTI MB[1].

[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini"; [2]Università degli Studi di Bari

Parole chiave: Suino, Diarrea, Rotavirus
***Key words*:** Pigs, Diarrhea, Rotavirus

RIASSUNTO: I Rotavirus (RVs) sono considerati una delle principali cause di enterite acuta nei suini. Nel pre- e post-svezzamento, l'infezione è molto severa nei suinetti e causa ingenti perdite economiche. Cinque diversi gruppi (RVA, B, C, E, H) sono stati associati a diarrea nel suino, di cui il gruppo A è quello più diffuso. La prevalenza dei gruppi non-A (RVB, RVC e RVH), è stata riportata in diversi Paesi e sembrerebbe correlata con l'età dei suini. In Italia sono disponibili dati sulla distribuzione del gruppi A e C in suinetti svezzati, ma non sulle infezioni da RVB e RVH. Considerato l'alto tasso d'incidenza dei gruppi RV non-A in molti Paesi e l'importanza clinica delle enteriti da RV nei suinetti sottoscrofa e svezzati, sarebbe importante conoscerne la distribuzione e l'impatto sul territorio. A tal scopo, abbiamo sviluppato due saggi di Real-Time RT-PCR multiplex per la rilevazione simultanea di RVA/B e RVC/H. Sono stati esaminati 92 suinetti sottoscrofa e 106 svezzati con sintomatologia enterica. La presenza di RV è stata riscontrata in un'elevata percentuale di suinetti sottoscrofa (72%) e svezzati (82%), di cui il gruppo A è predominante (60%). E' stata inoltre rilevata la presenza di RVB e RVH con percentuali rispettivamente pari a 36% e 8.5%. Infezioni miste da RVB, C e H sono risultate più frequenti nei soggetti svezzati, suggerendo un diverso impatto di questi RV nelle due categorie di età. Inoltre, sono state evidenziate chiare associazioni tra RV e altri patogeni intestinali, suggerendo un possibile sinergismo nella patogenesi delle enteriti.

ABSTRACT: Rotaviruses are considered a major cause of acute diarrhea in swine. In suckling and weaned piglets, the infection is severe and causes relevant economic losses. Five different rotavirus groups (A, B, C, E, H) have been associated with diarrhea in swine, with RVA being the most common and studied. The presence of non-A groups (RVB, RVC and RVH) has been reported in several countries and it is supposed to be associated to age. Conversely, in Italy only limited information is available about RVC diffusion in weaned piglets, whilst there is no data about RVB and RVH infection. Therefore, due to the high incidence of the non-A RVs in many countries and to their clinical relevance in piglet enteritis, it would be advisable to collect data about their distribution in swine herds and to evaluate their impact on the swine livestock production. Accordingly, we developed two distinct multiplex Real-Time RT-PCR assays able to detect either RVA/B or RVC/H. Overall, 92 suckling and 106 weaned piglets with clinical disease were examined. RV presence was common in suckling and weaned piglets, with RVA being predominant (60%). RV B and RVH were detected with percentage of 36% and 8.5%, respectively. RVB, C and H mixed infections were more common in weaned piglets, suggesting a

different impact between the two age categories. In addition, the availability of diagnostic data on intestinal pathogens allowed observing a link between RVs and other intestinal pathogens, suggesting possible synergisms in the pathogenesis of enteritis.

INTRODUZIONE

I Rotavirus (RVs) rappresentano una delle cause più comuni di diarrea nell'uomo e negli animali. In particolare, nei suinetti sottoscrofa e negli svezzati le enteriti da RV sono associate a ritardo nella crescita, alta morbilità, mortalità ed elevato consumo di farmaci, aspetti che incidono profondamente sull'economia delle aziende suinicole. I RV (famiglia dei Reoviridae) posseggono un genoma composto da 11 segmenti di RNA a doppio filamento e sono classificati in dieci gruppi (da A a J) sulla base delle proprietà antigeniche e genetiche della proteina capsidica VP6 (1-3). Cinque (RVA-E) dei dieci gruppi sono associati a diarrea nel suino (4-6). Il picco d'incidenza dei diversi gruppi di RV varia con l'età e le condizioni in allevamento. I RVs di gruppo A sono considerati la causa più frequente di enterite nei suinetti in tutto il mondo, e sono stati ampiamente caratterizzati per quanto riguarda la loro diffusione, patogenicità e la diversità genetica (5,7-8). Studi epidemiologici condotti tra il 2009 e il 2011 in USA hanno riportato una prevalenza di RVA di circa il 70% in suini sintomatici. Viceversa, i RV non –A, definiti anche "atipici", sono meno studiati. Solo negli ultimi anni, sono stati raccolti numerosi dati sulla loro diffusione a livello mondiale, ma un monitoraggio completo, a livello nazionale, non è ancora stato effettuato. La presenza del gruppo C è stata documentata in episodi sporadici di diarrea suina in lattanti e svezzati in diversi Paesi e in alcuni allevamenti italiani (9-11). RVE è stato identificato in un caso isolato in UK ma mancano dati attendibili sulla sua distribuzione attuale. Viceversa, infezioni da parte di RV di gruppo B e H sono state riscontrate in USA, Giappone, Brasile, e in alcuni paesi Europei (12-14), ma nessun dato sulla loro presenza è stato raccolto in Italia. Sebbene il ruolo specifico di questi gruppi (RVB, RVC e RVH) nella patogenesi delle enteriti non sia ancora noto, l'elevata incidenza a livello mondiale evidenzia l'importanza di raccogliere informazioni sulla loro distribuzione a livello nazionale. A tal scopo, abbiamo sviluppato saggi di RT-PCR Real time per la rilevazione dei gruppi A, B, C e H ed abbiamo analizzato campioni con sintomatologia clinica. Il nostro studio è stato condotto su suinetti sottoscrofa e svezzati, categorie in cui la malattia è più severa e frequentemente associata a mortalità. Inoltre, per avere un quadro clinico più ampio, è stata valutata l'associazione dell'infezione da RV con altri patogeni enterici (PEDV, *E.Coli* e *Clostridium perfrigens)* coinvolti nelle gastroenteriti dei suinetti.

MATERIALI E METODI

Raccolta campioni e processamento

La ricerca di RV è stata effettuata su campioni fecali o intestinali ottenuti da 92 suinetti sottoscrofa e 106 svezzati con sintomatologia enterica. Lo studio della presenza d'infezioni miste da RV e altri patogeni enterici (PEDV, *E.coli* e *Clostridium perfrigens*) è stato effettuato su 61 campioni fecali di suinetti sottoscrofa e 37 di suini svezzati con diarrea. Tutti i campioni analizzati sono stati raccolti tra Novembre 2016 e Luglio 2018 ed erano provenienti da allevamenti della Lombardia.

1 g di feci o di contenuto intestinale sono stati diluiti in 10 ml di MEM (10% Peso/Volume) e vortexati fino ad ottenere un'omogeneizzazione completa. I campioni sono stati centrifugati per 10 minuti a 3000x g a 4°C per favorire la precipitazione del materiale fecale.

Rilevazione RV e PEDV

L'RNA virale è stato estratto da 200 µl di omogenato di tessuto o fecale al 10% peso/volume utilizzando il kit Nucleomag® 96 M-Medical/VET (Macherey-Nagel) in sistema semi-automatico KingFisher seguendo le istruzioni del produttore. Ad ogni campione è stato aggiunto un controllo interno di reazione, costituito da RNA esogeno (IC). L'identificazione di rotavirus di gruppo A, B, C e H è stata effettuata tramite due RT-PCR Real time multiplex per un frammento del gene vp6 gruppo-specifico. La presenza di PEDV è stata rilevata tramite amplificazione, con saggio RT-PCR real time, di una regione del gene S1. L'RNA esogeno è stato amplificato con primers e sonde specifiche al fine di individuare campioni non estratti correttamente o che presentano inibitori della reazione di RT-PCR Real time.

Isolamento e genotipizzazione batterica

L'isolamento di *E.coli* è stato effettuato su piastre agar sangue e agar Gassner a 37°C in condizioni di aerobiosi. Le specie di *E.coli* enterotossici (ETEC) sono state rilevate tramite PCR multiplex per i geni codificanti per le tossine (LT I, STaP, STb, STX2e) e le adesine (F4, F5, F6, F41 e F18). Per l'isolamento di *Clostridium perfrigens,* le feci sono state strisciate su piastre di agar sangue e incubate in anaerobiosi a 37°C per 24 o 48 ore.

Analisi statistica

I calcoli di prevalenza e relativo intervallo di confidenza al 95% sono stati eseguiti col software Microsoft Excel® 2010 (Microsoft Co, USA). Il confronto tra le frequenze d'infezione da RV e gli altri patogeni enterici (PEDV, *E.coli e Clostridium perfrigens*) nelle diverse categorie d'età è stato eseguito col test esatto del chi-quadrato.

RISULTATI

Presenza dei diversi gruppi di RV

In questo studio è emerso che il 73.9% (68/92) delle enteriti nei suinetti sottoscrofa e l'82% (87/106) negli svezzati sono associate a presenza di RVs. Per quanto riguarda i gruppi, RVA è il più diffuso nei suinetti sottoscrofa (60%), presente come infezione singola (32%) o associato agli altri gruppi (28%), seguito da RVB (27%) e RVC (25%). RVH è stato identificato solamente nell'1% dei suinetti sottoscrofa. Tra i suini svezzati, i gruppi A e C sono i più frequenti (61% per RVA e 63% per RVC), seguiti da RVB (42%) e RVH (15%) (Fig. 1). Una maggiore presenza dei gruppi B, C e H è stata rilevata nella categoria degli svezzati rispetto a quella dei sottoscrofa ($p<0.05$). Infezioni singole dei gruppi A, B, C sono presenti in entrambe le categorie di età. In particolare, la presenza di RVA, come singolo gruppo infettante, è significativamente maggiore nei suinetti sottoscrofa ($p<0.05$). RVH non è mai presente come singolo gruppo infettante ma solamente in associazione con gli altri gruppi.

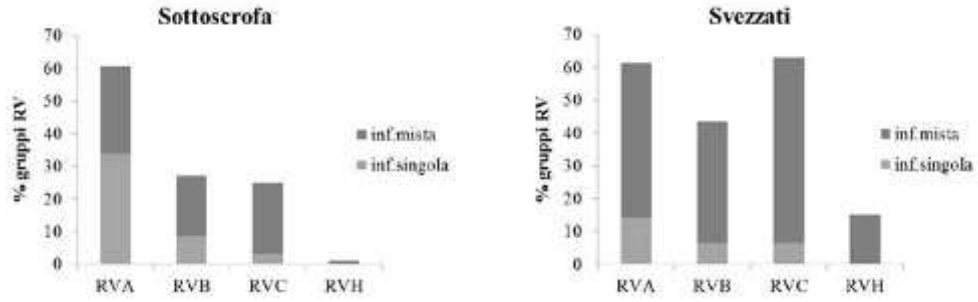
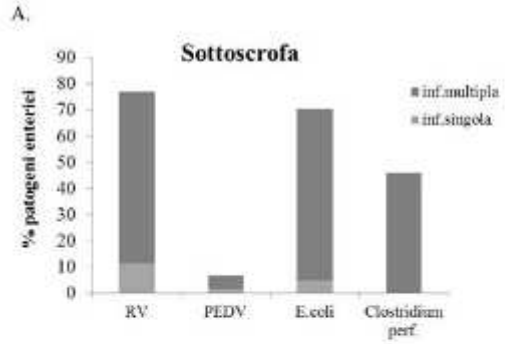


Figura 1. Presenza dei diversi gruppi di RV come infezione singola o combinata in suinetti sottoscrofa (N=92) e svezzati (N=106).
Figure 1. Presence of RV groups as single or mixed infection in suckling (N=92) and weaned piglets (N=106).

Co-infezione da RV e altri patogeni enterici
Un sottogruppo di 61 campioni ottenuti da suinetti sottoscrofa e 37 da svezzati con sintomi enterici, sono stati analizzati per la presenza di altri patogeni intestinali quali il virus della diarrea epidemica suina (PEDV), *E.coli* e *Clostridium perfrigens*. I patogeni virali e batterici sono stati rilevati nella quasi totalità dei campioni analizzati (95% di positività nei suinetti sottoscrofa e 97% negli svezzati). I RVs sono presenti come singoli agenti infettanti nel 11.5% dei suinetti sottoscrofa e nel 16% degli svezzati (Fig. 2, A-B). In entrambe le categorie di età, la presenza di RVs è associata ad altri patogeni enterici (65% dei casi), di cui *E.coli* è il patogeno maggiormente presente (35% delle infezioni da RV nei suinetti sottoscrofa e 39% negli svezzati). Dei 43 isolati di *E.coli*, nei suinetti sottoscrofa, 16 sono stati caratterizzati per la presenza di fattori enterotossici (ETEC), di cui 2 sono risultati positivi. Nella categoria degli svezzati, 13 dei 21 isolati di *E.coli* sono stati analizzati per il tipo ETEC, di cui 4 sono risultati positivi. Il PEDV è stato rilevato solamente in 4 dei 61 (6.5%) campioni appartenenti alla categoria sottoscrofa mentre è presente in una maggior casistica negli svezzati (30%, $p<0.05$), ed è associato a RV nell'11% dei casi. *Clostridium perfrigens* è stato isolato da 28 campioni (46%) di suinetti sottoscrofa e da 1 (2%) campione di suinetti svezzati, sempre in associazione con altri patogeni (Fig. 2, A-B).



Combinazione dei patogeni	N casi (%)
RV+*E.coli*+*C.perfrigens*	15 (24,5%)
RV+*E.coli*	13 (21,3%)
RV	7 (11,5%)
E.coli+*C.perfrigens*	7 (11,5%)
RV+*C.perfrigens*	5 (8,1%)
RV+ETEC, *E.coli* emolitico	4 (6,5%)
E.coli	3 (4,9%)
RV+PEDV	2 (3,3%)
RV+PEDV+*E.coli*+*C.perfrigens*	1 (1,6%)
PEDV	1 (1,6%)
negativi	3 (4,9%)
totale	61 (100%)

Combinazione dei patogeni	N casi (%)
RV+*E.coli*	8 (21,6%)
RV+PEDV	7 (18,9%)
RV	6 (16,2%)
RV+*E.coli* emolitico	4 (10,8%)
PEDV+*E.coli*	4 (10,8%)
RV+*E.coli*+*C.perfrigens*	3 (8,1%)
RV+*C.perfrigens*	1 (2,7%)
RV+ETEC+*C.perfrigens*	1 (2,7%)
PEDV	1 (2,7%)
E.coli	1 (2,7%)
negativi	1 (2,7%)
totale	37 (100%)

Figura 2. Presenza di RV, PEDV, *E.coli* e *Clostridium perfrigens,* come infezione singola o infezione mista, in suinetti sottoscrofa (N=61) (A), e svezzati (N=37), (B). In tabella sono riportate le combinazioni di patogeni rilevate con la relativa frequenza.
Figure 2. Presence of RV, PEDV, *E.coli* and *Clostridium perfrigens* as single or mixed infection in suckling (N=61), (A), and weaned piglets (N=37), (B). The table shows the combinations of the detected pathogens with the relative frequency.

Andamento temporale dell'infezione da RV
L'infezione da RV, osservata nel periodo compreso tra Gennaio 2017 e Luglio 2018, mostra delle fluttuazioni temporali comuni per entrambe le categorie di età analizzate. Il maggior numero d'infezioni è stato osservato nei mesi di Gennaio-Marzo per l'anno 2017 e Febbraio-Aprile per il 2018. Qualche picco d'infettività è stato rilevato nei mesi estivi di Giugno, Luglio del 2017 (Fig.3).

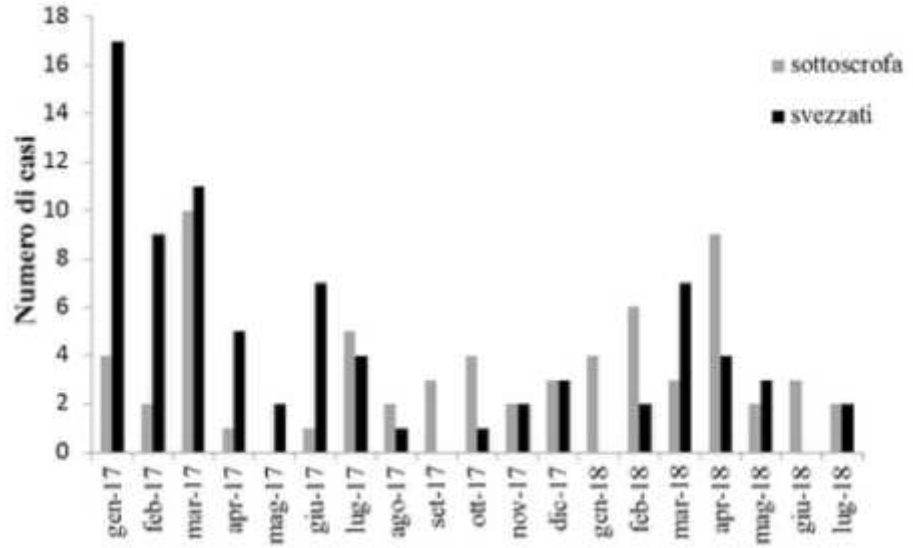


Figura 3. Distribuzione dell'infezione da RV nel periodo compreso tra Gennaio 2017 e Luglio 2018 nei suinetti sottoscrofa e svezzati.
Figure 3. Distribution of RV infection between January 2017 and July 2018 in suckling and weaned piglets.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi diagnostica, effettuata tramite PCR real time specifica per i RV-A, B, C e H, ha permesso di ottenere nuove informazioni sulla diffusione dei diversi gruppi di RV in suinetti sottoscrofa e svezzati in allevamenti della Lombardia. Lo studio è stato effettuato sui suinetti al di sotto dei 2 mesi di età, nei quali le infezioni da Rotavirus causano una sintomatologia più severa con conseguente impatto negativo sulla produzione suinicola. Dal nostro studio è emersa un'elevata prevalenza di RV nei suinetti sottoscrofa (73%) e svezzati (82%), in linea con la diffusione osservata in USA tra il 2009 e il 2012. Considerando la distribuzione dei diversi gruppi, RVA è presente in un elevato numero di casi (60%), spesso come singolo gruppo infettante nei suinetti sottoscrofa (32%). Questo dato suggerisce un ruolo preponderante di RVA nella patogenesi delle enteriti in questa categoria di età. Questo studio ha evidenziato per la prima volta la presenza di RVB e RVH sul territorio italiano con percentuali considerevoli specialmente per RVB (36%). L'elevata frequenza d'infezione da RVB, C e H, riscontrata in fase di svezzamento, suggerisce un probabile ruolo epidemiologico nelle infezioni enteriche, distinto per le diverse categorie di età. In particolare, la maggior incidenza di RV in fase di svezzamento potrebbe essere riconducibile al decremento dell'immunità passiva colostrale. I nostri dati mostrano che RVH non è mai presente come singolo gruppo infettante ma è associato alla presenza dei gruppi A, B e C. Ciò potrebbe essere dovuto a una sua minor virulenza, che verrebbe però incrementata dalla co-presenza di altri gruppi.

Per quanto riguarda l'analisi combinata con altri patogeni enterici, i RVs sono presenti come singolo agente infettante nell'11% delle enteriti dei suinetti sottoscrofa e nel 16% degli svezzati suggerendo un ruolo eziologico primario. Infezioni miste da RV ed *E.Coli* sono state osservate nel 30% circa dei campioni analizzati. *Clostridium perfrigens* è stato rilevato in alta percentuale, nei suinetti sottoscrofa, in associazione con altri patogeni suggerendo un ruolo patogenico importante nelle co-infezioni.

Un'associazione significativa tra RV e PEDV è stata riscontrata nei suinetti svezzati. In questi casi, la presenza di RV sembrerebbe favorire l'infezione da parte del PEDV, che come singolo agente infettante è presente solo nel 2,7% dei casi. Per quanto riguarda la distribuzione stagionale, il maggior numero di casi d'infezione da RV è stato riscontrato nei mesi più freddi (tra Gennaio-Marzo), con dei picchi nei mesi estivi di Giugno-Luglio. Pertanto non si può parlare di una vera e propria stagionalità della malattia ma bensì di fluttuazioni spazio-temporali. Probabilmente, oltre a fattori climatici, quali temperatura e umidità, altre componenti, come la presenza di altri patogeni, influiscono sulla diffusione della malattia. L'utilizzo di strumenti diagnostici specifici per i RV A e non-A ha permesso di avere un quadro più completo sulla presenza di Rotavirus nelle infezioni enteriche ponendo le basi per una comprensione più approfondita ed una gestione più mirata delle enteriti in allevamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Matthijnssens J., Otto P.H., Ciarlet M., Desselberger U., Van Ranst M., Johne R. (2012). VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. Arch. Virol. 157, 1177–1182.
2. Mihalov-Kovacs E., Gellert A., Marton S., Farkas S.L., Feher E., Oldal M., Jakab F., Martella V., Banyai K. (2015). Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. Emerg. Infect. Dis. 21, 660–663.
3. Banyai K., Kemenesi G., Budinski I., Foldes F., Zana B., Marton S., Varga-Kugler R., Oldal M., Kurucz K., Jakab F. (2017). Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. Infect. Genet. Evol. 48, 19–26.
4. Monini M, Zaccaria G, Ianiro G, Lavazza A, Vaccari G, Ruggeri FM. (2014). Full-length genomic analysis of porcine rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in Northern Italy. Infect Genet Evol. 25, 4-13.
5. Marthaler D, Homwong N, Rossow K, Culhane M, Goyal S, Collins J, Matthijnssens J, Ciarlet M. (2014). Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. J Virol Methods. 209, 30-4.
6. Martella V, Bányai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. (2010). Zoonotic aspects of rotaviruses. Vet Microbiol. 140, 246-55.
7. Rebecca Chandler-Bostock, Laura R. Hancox, Sameena Nawaz, Oliver Watts, Miren Iturriza-Gomara, Kenneth M. Mellits. (2014). Genetic diversity of porcine group A rotavirus strains in the UK. Vet Microbiol. 174(3-4), 609.
8. Chandler-Bostock R, Hancox LR, Payne H, Iturriza-Gomara M, Daly JM, Mellits KH. (2015). Diversity of group A rotavirus on a UK pig farm. Vet Microbiol. 180(3-4), 205-11.
9. Theuns S, Conceição-Neto N, Zeller M, Heylen E, Roukaerts ID, Desmarets LM,Van Ranst M, Nauwynck HJ, Matthijnssens J. (2016). Characterization of a genetically heterogeneous porcine rotavirus C, and other viruses present in the fecal virome of a non-diarrheic Belgian piglet. Infect Genet Evol. 43, 135-45.
10. Kim Y, Chang KO, Straw B, Saif LJ. (1999). Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. J Clin Microbiol. 37(5), 1484-8.
11. Martella V, Bányai K, Lorusso E, Bellacicco AL, Decaro N, Camero M, Bozzo G, Moschidou P, Arista S, Pezzotti G, Lavazza A, Buonavoglia C. (2007). Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. Vet Microbiol. 123(1-3), 26-33.

12. Marthaler, D.; Suzuki, T.; Rossow, K.; Culhane, M.; Collins, J.; Goyal, S.; Tsunemitsu, H.; Ciarlet, M.; Matthijnssens, J. (2014). VP6 genetic diversity, reassortment, intragenic recombination and classification of rotavirus B in American and Japanese pigs. Vet. Microbiol. 172, 359–366.
13. Almeida PR, Lorenzetti E, Cruz RS, Watanabe TT, Zlotowski P, Alfieri AA, Driemeier D. (2018). Diarrhea caused by rotavirus A, B, and C in suckling piglets from southern Brazil: molecular detection and histologic and immunehistochemical characterization. J Vet Diagn Invest. 30(3), 370-376.
14. Shepherd FK, Murtaugh MP, Chen F, Culhane MR, Marthaler DG. (2017). Longitudinal Surveillance of Porcine Rotavirus B Strains from the United States and Canada and In Silico Identification of Antigenically Important Sites. Pathogens. 3, 6(4).

PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2019
VINCITORE

CARATTERIZZAZIONE METABOLOMICA DEL COLOSTRO DI TRE RAZZE DI SCROFE E ANALISI DELLA SUA INFLUENZA SULLE PERFOMANCE DI CRESCITA E SOPPRAVVIVENZA DEI SUINETTI

METABOLOMICS CHARACTERIZATION OF COLOSTRUM IN THREE SOW BREEDS AND ITS INFLUENCES ON PIGLETS' SURVIVAL AND LITTER GROWTH RATES

PICONE G.[1*], ZAPPATERRA M. [1*], **LUISE D**.[1*], TRIMIGNO A.[1], CAPOZZI F.[1], MOTTA V.[1], DAVOLI R[1]., NANNI COSTA L.[1], BOSI P. [1], TREVISI P.[1]

[1]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari - Università di Bologna, 40127, Bologna, IT

[*]Gli autori hanno contribuito equamente alla ricerca

Parole chiave*: Colostro, ^{1}H-NMR-spettroscopia, Metaboloma, Razza, sopravvivenza suinetti*
Keywords: *Colostrum, ^{1}H–NMR spectroscopy, Metabolome, Pig breed, Piglets survival*

RIASSUNTO

Il colostro è la prima secrezione della ghiandola mammaria, secreto già nelle ore precedenti il parto e nei 2-3 giorni successivi. Differisce per composizione dal latte e rappresenta per il suinetto la principale fonte di immunità passiva, composti prebiotici e fattori di crescita. Lo scopo del presente studio è quello di fornire nuove informazioni sulla composizione del colostro suino e d'individuare le associazioni tra la sua composizione in termini di metaboliti, con razza, sopravvivenza e performance della nidiata. In totale 58 campioni di colostro sono stati raccolti da altrettante scrofe di 3 razze italiane: 31 Large White, 15 Landrace e 12 Duroc. Il colostro è stato sgrassato, ultrafiltrato con filtro a 10kDa e analizzato con spettrografia ^{1}H-NMR. Sono stati identificati 25 composti inclusi monosaccaridi, disaccaridi (lattosio), acidi organici (lattato, citrato e formiato), acidi organici azotati (creatinina) e nucleotidi. La razza e la stagione del parto hanno influenzato la composizione del colostro. Quantità crescenti di taurina e acetato sono state associate rispettivamente con la miglior sopravvivenza e accrescimento della nidiata mentre dimetilammina e cis-aconitato sono associati con la ridotta sopravvivenza dei suinetti. I risultati ottenuti suggeriscono che la composizione del colostro è influenzata da razza e condizioni ambientali, che possono quindi modificarne il contenuto di metaboliti influenzando le performance della nidiata.

ABSTRACT

Colostrum is the first secretion produced by mammary glands during the hours immediately preceding the parturition and during the following 2-3 days. Colostrum differs from milk and represents an essential vehicle of passive immunity, prebiotic compounds and growth factors for piglets. The aim of the present study is to provide new information about pig colostrum composition and the associations between metabolites, the sows' breed and the survival and growth rates of their litters. Colostrum samples were gathered from 58 parturitions of healthy sows belonging to 3 Italians breeds: 31 Large White, 15 Landrace and 12 Duroc respectively. The defatted and ultrafiltered (10 kDa) colostrum samples were analysed using ^{1}H–NMR spectroscopy. Twenty-five metabolites were identified, comprehending monosaccharides, disaccharides (such as lactose), organic acids (lactate, citrate, acetate and formate), nitrogenous organic acids (such as creatine) and nucleotides. Breed and season of farrowing influenced the colostrum composition. Taurine and acetate were positively related to piglets' survival rate and litter weight gain, respectively,

while dimethylamine and cis-aconitate were linked to new-borns' impaired ability to survive. The results obtained suggest that colostrum composition is affected by breed and environmental conditions which may affect the colostrum metabolites content with possible consequences on piglets' performances.

INTRODUZIONE

La sopravvivenza dei suini è influenzata principalmente dall'assunzione di colostro e dal peso dei suinetti alla nascita. Questi fattori influiscono inoltre sulle future performance di accrescimento della nidiata stessa (Ferrari et al., 2014). Il colostro rappresenta la principale fonte di energia e di immunità passiva per il suinetto. Recenti studi volti ad analizzare la composizione di latte e colostro bovino e umano hanno dimostrato che oltre alle già note immunoglobuline, vi sono diversi composti con funzioni bioattive, in grado di migliorare la salute dei neonati (Schlimme et al., 2000; Korhonen et al., 2013). Per quanto riguarda il colostro suino tali informazioni non sono ancora disponibili, così come non sono noti gli effetti genetici ed ambientali sulla sua composizione. Lo scopo del presente studio è quello di fornire nuove informazioni sulla composizione del colostro suino e d'individuare le associazioni tra metaboliti del colostro, razza delle scrofe e performance della nidiata.

MATERIALI E METODI

Le procedure sono conformi alla legislazione italiana relativa agli animali da sperimentazione e sono state approvate dal comitato etico-scientifico per la sperimentazione animale dell'Università di Bologna, Italia.

Animali e campionamenti

In totale 58 campioni di colostro sono stati raccolti da scrofe di 3 diverse razze:12 Duroc (D), 15 Landrace (L) e 31 Large White (LW), allevate nello stesso allevamento. Dalla 4° settimana post-inseminazione, le scrofe sono state allevate in box di gruppo ed alimentate con 2.5 kg/giorno di dieta a base di orzo, crusca di grano tenero e soia. A 5 giorni dal parto, le scrofe sono state spostate in box singoli. Al momento del parto, non indotto, il colostro è stato raccolto dopo la nascita del primo suinetto e prima della nascita dell'ultimo, avendo cura di prelevarne da tutti i capezzoli. I campioni sono stati congelati immediatamente e conservati a -80 **C°**. La data del parto **è stata registrata**. Il peso di ogni nidiata e la mortalità sono state rilevate alla nascita ed al 3° giorno di vita.

Preparazione e analisi ^{1}H–NMR del colostro

Quindici mL di colostro scongelato sono stati diluiti in proporzione 1:1 con acqua pura ed addizionati di 0.02% di sodio azide per inibire la crescita batterica. Il campione è stato sgrassato attraverso ripetute centrifugazioni a 4 C° per 30 minuti a 1500 × g. Cinque mL di fase liquida sono stati filtrati (< 10kDa) mediate apposite provette (Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germania). Il campione filtrato è stato quindi liofilizzato.

Per ogni **µg** di campione liofilizzato sono stati aggiunti 250 **µL** di acqua distillata. Ottanta **µL** del campione ricostituito sono stati miscelati con 720 **µL** di acqua distillata e 100 **µL** di una soluzione D_2O di 3-(trimetilsilil)-propionato-2,2,3,3-d4 (Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury, MA, USA) per ottenere una concentrazione finale di 6.25 mmol/L. I campioni sono stati analizzati con ^{1}H–NMR utilizzando lo spettrometro AVANCE (Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany) ad frequenza di 600.13 MHz. Gli spettri sono stati acquisiti a 32 K punti su una lunghezza spettrale di 7,211.54 Hz (112 ppm). Gli spettri sono stati corretti utilizzando il software TopSpin (versione 3.0; Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany). I segnali sono stati assegnati utilizzando come riferimento il database Chenomx ed informazioni bibliografiche.

Elaborazione dei dati

In base al rispettivo ordine di parto (OP), le scrofe sono state divise in 2 gruppi: OP1= dal 1° al 3° ordine di parto (27 scrofe); OP2 = dal 4° ordine di parto in poi (31 scrofe). La stagione in cui è

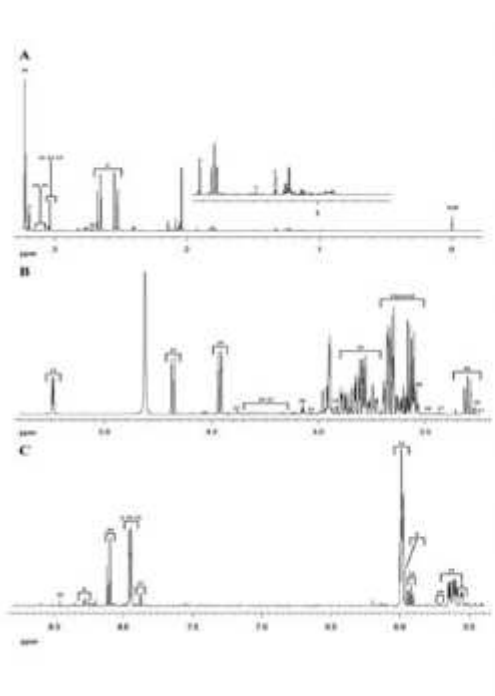
avvenuto il parto è stata classificata da 1 a 4 come segue: 1 = parto tra 1/12 – 28/02 (6 scrofe); 2 = parto tra 01/03 – 31/05 (19 scrofe); 3 = parto tra il 01/06 – 31/08 (21 scrofe); 4 = parto tra il 1/09 e 30/11 (12 scrofe). Gli spettri sono stati analizzati con l'analisi delle componenti principali (PCA). I composti identificati sono stati analizzati tramite ANOVA per valutare l'effetto di razza, stagione, ordine di parto e numerosità della nidiata alla nascita. L'effetto è stato considerato significativo con livello $P<0.05$. I dati di sopravvivenza e performance della nidiata sono stati analizzati inizialmente con tecnica STEP-WISE includendo come fattori i composti identificati nel colostro, la razza della scrofa e la stagione in cui è avvenuto il parto ed in seguito con modello ANOVA.

RISULTATI

Le scrofe di razza D hanno presentato un numero inferiore di suinetti nati vivi per nidiata (8.92 ± 2.28) rispetto a scrofe di razza L (12.60 ± 1.72) e LW (11.90 ± 2.26) ($P<0.0001$). I suinetti di razza L e LW avevano un peso inferiore alla nascita (1.38 ± 0.15 kg e 1.43 ± 0.16 kg, rispettivamente) rispetto ai suinetti di razza D (1.59 ± 0.23 kg) ($P=0.007$).

Caratterizzazione NMR del colostro suino

In **Figura 1** sono elencati i 25 composti identificati nel colostro ed i corrispondenti spettri ^{1}H-NMR. Nella regione dello spettro compresa tra 3.49 e 4.49 ppm sono stati identificati zuccheri quali lattosio, UDP-glucosio, UDP-galattosio e nucleotidi come UMP. Nella regione dello spettro compresa tra 0,99 e 3,49 ppm sono stati identificati alcuni amminoacidi come treonina, alanina, creatina ed alcuni acidi organici come acido lattico, acido acetico, acido succinico ed acido citrico. Nella regione compresa tra 5,5 e 8,4 ppm sono stati osservati composti fenolici tra cui l'acido formico e ulteriori segnali riconducibili a nucleotidi e zuccheri UDP-glucosio, UDP-galattosio e UMP.



Numero assegnazione	^{1}H δδδ (ppm) *	Composto
1	1.332 (d)	Lattato
2	1.488 (d)	Alanina
3	1.923 (s)	Acetato
4	2.028 (s)	N-acetilglutammato
5	2.063 (s)	N-acetilglucosamina
6	2.089 (s) - 5.552(dd) - 5.967 (d) - 7.944 (d) - 8.297 (d)	UDP-N-Acetilglucosamina
7	2.347 (s) -3.222 (s)	O-acetilcolina
8	2.408 (s)	Succinato
9	2.539 (d) - 2.667 (d)	Citrato
10	2.720 (s)	Dimetilammina
11	3.039 (s)	Creatina
12	3.046 (s)	Creatina fosfato
13	3.050 (s)	creatinina
14	3.219 (d) - 5.712 (m)	Cis-aconitato
15	3.204 (s)	Colina
16	3.231(s) - 4.330 (m)	sn-glicero-fosfocolina
17	3.272(t) - 3.552 (dd) - 4.071 (t)	Mioinositolo
18	3.259 (t) - 3.428 (t)	Taurina
19	3.302 (t) -3.684-3.906 (m), 3.990 (d) 4.461 (d) - 4.679 (d) - 5.249 (d)	Lattosio
20	3.480 (s) - 4.142-4.278 (m) -5.507 (dd) - 5.967 (m) -7.940 (d)	UDP-glucosio
21	3.935 (s)	Glicolato
22	4.142-4.278 (m) - 4.379 (m) - 5.664 (dd) - 5.990 (m) - 7.942 - 7.995(d)	UDP-galattosio
23	5.917 (d) - 7.879 (d)	Uridina
24	8.456 (s)	Formiato
25	4.421 (t) - 5.990 (m) - 8.192 (d)	UMP

Figura 1. Caratterizzazione dello spettro di colostro di scrofa ottenuto con tecnica ^{1}H-NMR
Figure 1. ^{1}H-NMR spectra of sows colostrum and identified metabolites.

Effetto della razza e della stagione sul profilo metabolico del colostro

Il dataset finale costituito da 58 campioni di colostro e 201 bins è stato analizzato con tecnica PCA. L'OP della scrofa non ha influenzato la composizione del colostro. In Figura 2A è possibile osservare l'effetto della razza: i campioni clusterizzano lungo la 1° e la 2° componente principale (PC). La PC1 spiega l'81% della varianza totale e separa rispettivamente il cluster relativo al colostro di scrofe D rispetto a quello relativo a scrofe LW. La PC2 spiega il 10 % della varianza totale e discrimina il colostro di scrofe L rispetto quello di scrofe LW e D. Analizzando le PC2 e PC3 (varianza spiegata totale = 14%), è possibile osservare che i campioni clusterizzano in accordo con la stagione in cui è avvenuto il parto (Figura 2B). La PC2 discrimina il cluster relativo ai campioni raccolti durante le stagioni 1 e 4 (autunno-inverno) rispetto ai campioni raccolti durante le stagioni 2 e 3 (primavera-estate).

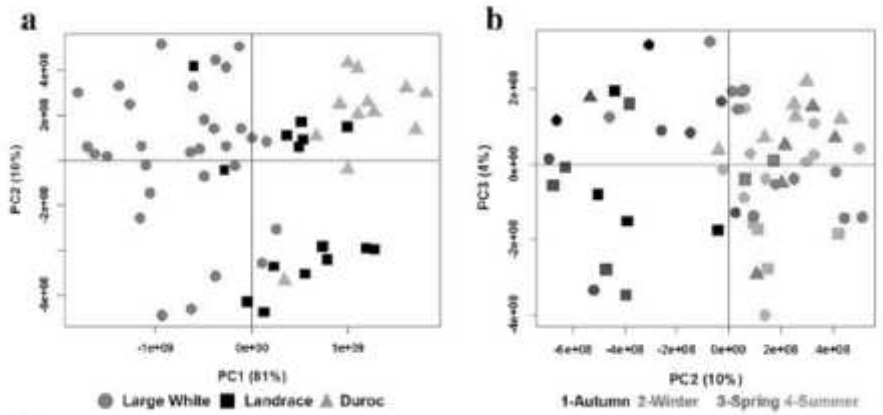


Figura 2. Score plot della PCA eseguita su spettri binnati di colostro di scrofa ottenuti con tecnica ^{1}H–NM. a) PC1 e PC2 b) PC2 e PC3.
Figure 2. Score plots of PCA on 1H–NMR binned spectra of sows' colostrum. a) PC1 vs. PC2 b) PC2 vs. PC3

In Tabella 1 sono riportati i risultati dell'analisi ANOVA per l'effetto di razza e stagione sui composti identificati. La razza ha influenzato la quantità di lattosio, UDP-glucosio, glicolato, UDP-galattosio (P<0.001), citrato, N-acetilglucosamina (P<0.01), alanina, succinato, creatina, creatina fosfato, cis-aconitato, o-acetilcolina, sn-glicerofosfocolina, UDP-N-acetilglucosamina, taurina e mio-inositolo (P<0.05). La stagione in cui è avvenuto il parto ha influenzato la quantità di acetato, dimetlammina, creatina-fosfato, creatinina, cis-aconitato, glicolato e formiato (P<0.001), creatina, taurina, UDP-galattosio, UMP (P<0.01) e alanina (P<0.05).

Tabella 1 Effetto di razza della scrofa e della stagione del parto sulla composizione di colostro
Table 1. Effect of sows parity order and season of farrowing on the colostrum composition

Metabolita	Razza[1]			SE	*P*-value	Stagione[2]				SE	*P*-value
	D	L	LW			1	2	3	4		
Lattato	5.38	6.7	8.88	1.85	NS	4.93	10.18	8.71	4.13	1.81	NS
Alanina	1.77	2.2	2.44	0.17	0.04	1.65	2.5	2.51	1.88	0.17	0.04
Acetato	9.57	11.17	9.9	0.91	NS	13.59	7.55	5.95	13.77	0.89	<.0001
N-Acetilglutamato	6.35	9.9	14.03	3.77	NS	7.94	9.69	8.53	14.21	3.69	NS
N-Acetilglucosamina	10.9	15.4	11.7	1.6	0.003	10.6	14	13.8	12.3	1.6	NS
UDP-N-Acetilglucosamina	22.4	34.4	33.9	2.2	0.01	26.2	33.4	33.8	27.4	2.1	NS
O-Acetilcolina	77.1	196.9	156.6	13.9	0.002	101.7	148.4	171.7	152.3	13.6	NS
Succinato	2.21	3.26	3.5	0.19	0.01	2.59	3.26	3.55	2.55	0.21	NS
Citrato	209	301	257	13	0.002	246	286	265	228	12	0.10
Dimetilammina	2.86	4.44	4.51	0.49	0.09	2.3	5.19	5.39	2.85	0.48	0.0003
Creatina	39.8	59.9	58.7	3.4	0.01	40.9	59	64.7	46.6	3.3	0.002
Creatina fosfato	3.4	7.99	8.01	0.88	0.02	1.9	8.5	10.78	4.69	0.86	<.0001
Creatinina	13.6	16.7	16.5	1.1	NS	19.9	11.8	11.6	19.2	1.1	<.0001
Cis-aconitato	1.41	1.93	1.74	0.14	0.03	1.1	2.14	2.28	1.26	0.14	<.0001
Colina	7.82	10.62	9.91	1.19	NS	8.86	11.64	9.43	7.87	1.16	NS
sn-Glicerofosfocolina	446	543	414	38	0.04	430	457	507	477	37	NS
Mio-inositolo	63.53	76.95	82.86	3.76	0.01	62.58	73.17	81.13	80.91	3.68	0.08
Taurina	1.57	4.1	6.05	0.87	0.02	0.98	6.23	6.19	2.21	0.85	0.005
Lattosio	458	579	811	30	<.0001	535	644	667	619	30	NS
UDP-glucosio	6.07	9.78	6.23	0.54	<.0001	6.08	7.3	8.09	7.97	0.54	NS
Glicolato	28.1	39.8	45.8	2.4	0.0006	28.4	41.8	45.9	35.6	2.3	0.001
UDP-galattosio	32.6	74	42.5	4	<.0001	39.3	54.2	61.4	44	3.9	0.005
Uridina	3.14	3.72	3.23	0.38	NS	3.05	3.55	3.49	3.37	0.38	NS
Formiato	4.49	4.43	4.03	0.35	0.06	6.27	3.04	2.29	5.67	0.34	<.0001
UMP	13.3	24.2	21.6	1.7	1.00	21.82	16.04	16.84	24.08	1.91	0.01

La media rappresenta l'area dello spettro assegnato. Razza[1]: D=Duroc, L=Landrace, LW=Large White. Stagione[2]: 1=01/12-28/02; 2=1/03-31/05; 3=1/06-31/08; 4=1/09-30/11

Effetto sulle performance e la sopravvivenza dei suinetti

L'analisi STEP-WISE ha evidenziato che oltre alle caratteristiche riproduttive della scrofa anche la quantità di alcuni metaboliti presenti nel colostro è in grado di influenzare i parametri di sopravvivenza e di performance della nidiata, mentre non è stato osservato nessun effetto per l'OP delle scrofe. I risultati significativi ottenuti dell'analisi STEP-WISE sono stati inseriti nel modello ANOVA. I risultati nell'analisi della varianza sono riportati in Tabella 2. **Tabella 2**. Risultati ANOVA per performance e sopravvivenza dei suinetti

Table 2. ANOVA results for piglet performance and survival rate

Variabile	Coefficiente	SE	*P*-value
IPG della nidiata			
Intercetta	0.89	0.69	NS
Razza			NS
LW[1]	0	0	
L[2]	-1.07	0.93	
D[3]	0.35	0.82	
Acetato*Razza			0.01
Acetato*LW[1]	0.09	0.05	
Acetato*L[2]	0.18	0.06	
Acetato*D[3]	0.02	0.08	
Peso suinetti alla nascita	0.01	0.01	<.0001
N. di suinetti svezzati			
Intercetta	9.2	1.82	<.0001
Razza			0.06
LW[1]	0	0	
L[2]	-1.82	1.53	
D[3]	-6.74	2.85	
Cis-aconitato*Razza			<0.01
Cis-aconitato* LW[1]	0.99	1.36	
Cis-aconitato* L[2]	-0.29	0.60	
Cis-aconitato* D[3]	-1.62	0.46	
N. di suinetti nati vivi	0.34	0.11	0.004
N. di suinetti morti a 3 giorni			
Intercetta	-2.23	0.76	0.005
Razza			0.03
LW[1]	0	0	
L[2]	0.19	0.20	
D[3]	-0.27	0.26	
Dimetilammina*Razza			0.001
Dimetilammina* LW[1]	-0.27	0.26	
Dimetilammina* L[2]	0.20	0.20	
Dimetilammina* D[3]	0.47	0.12	
Taurina*Razza			0.04
Taurina* LW[1]	-0.15	0.06	
Taurina* L[2]	-0.15	0.18	
Taurina* D[3]	0.17	0.21	
N. di suinetti nati vivi	0.13	0.06	0.04

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Questo è il primo studio che ha caratterizzato con tecnica NMR la composizione metabolica, a 10kDa, del colostro suino in diverse razze e che ha evidenziato associazioni tra i metaboliti presenti nel colostro e le performance di crescita e sopravvivenza della nidiata durante il periodo di lattazione.

In accordo con Blasco et al. (1995), il nostro studio ha confermato l'effetto della razza sulle performance riproduttive delle scrofe, infatti le razza LW e L hanno avuto un maggior numero di suinetti nati vivi rispetto la razza D, seppur di peso inferiore. Dal nostro studio si evince inoltre che la razza influenza la composizione del colostro. In particolare, il lattosio è risultato essere il principale metabolita in grado di discriminare il colostro di scrofe D da quello di scrofe LW, dove, in accordo con Zou et al (1992), la quantità di lattosio era superiore.

La composizione di colostro è inoltre risultata essere influenzata dalle condizioni ambientali, quali la stagione. Si è osservata una netta distinzione tra il colostro secreto durante il periodo autunnale-invernale rispetto a quello campionato nel periodo primaverile-estivo. Tale differenza può essere associata ai cambiamenti metabolici delle scrofe in funzione dei fattori ambientali, che hanno particolarmente influenzato il metabolismo energetico. Infatti la maggior quantità di acetato (coinvolto nella lipogenesi della ghiandola mammaria) osservata nel periodo invernale potrebbe essere collegata all'aumento del fabbisogno energetico delle scrofe che si riscontra nei periodi più freddi (Linzell et al., 1969). Così come l'incremento di creatinina e creatina fosfato e la riduzione di creatina nelle stagioni più calde potrebbe essere dovuto ad una maggiore degradazione di creatina in creatinina e creatina fosfato associata alla maggior mobilizzazione delle proteine muscolari che si riscontra nei periodi più caldi (Van Niekerk et al., 1963).

Specifici composti sono stati inoltre associati con i parametri di accrescimento e sopravvivenza delle nidiate. L'effetto favorevole dell'acetato sull'IPG della nidiata dalla nascita al 3°giorno di vita può essere spiegato dal suo utilizzo come substrato energetico per i colonociti, o dal suo impiego come precursore per la sintesi di colesterolo e acidi grassi a lunga catena (Den Besten et al., 2013). La correlazione positiva di taurina nel colostro con la miglior sopravvivenza dei suinetti si può ascrivere al ruolo chiave di questo aminoacido nello sviluppo del sistema nervoso centrale e di tessuti, oltre che nel miglioramento dell'assorbimento lipidico (Aerts et al., 2002; Gaull et al., 1989). L'effetto negativo di dimetilammina nel colostro sulla sopravvivenza dei suinetti è dovuto alla natura genotossica e irritante del composto. Allo stesso modo, anche quantità crescenti di cis-aconitato sono state associate a una maggior mortalità neonatale. Tale risultato probabilmente rispecchia l'alterazione del metabolismo energetico (in particolare il metabolismo dell'acido tricarbossilico) (Cantu et al., 2009) e della risposta immunitaria (O'Neill, 2015), meccanismi in cui il composto è coinvolto.

In conclusione il presente studio ha fornito una descrizione approfondita dei metaboliti presenti nel colostro di scrofa. Lo studio dimostra che il profilo metabolico del colostro è fortemente influenzato dalla razza della e dalle condizioni ambientali. Si è inoltre evidenziato che specifici metaboliti presenti nel colostro possono influenzare le performance di crescita e la sopravvivenza della nidiata.

BIBLIOGRAFIA

1. Aerts L, Van Assche FA. 2002. "Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period" J Perinat Med.30,281–6.
2. Cantu D, Schaack J, Patel M. 2009. "Oxidative inactivation of mitochondrial aconitase results in iron and H2O2-mediated neurotoxicity in rat primary mesencephalic cultures". PLoS One. 4:e7095
3. Den Besten G, Lange K, Havinga R, Van Dijk TH, Gerding A, Van Eunen K, et al. 2013.

”Gut-derived short-chain fatty acids are vividly assimilated into host carbohydrates and lipids”. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.305,900–10
4. Ferrari CV, Sbardella PE, Bernardi ML, Coutinho ML, Vaz IS, Wentz I, et al. 2014. “Effect of birth weight and colostrum intake on mortality and performance of piglets after cross-fostering in sows of different parities”. Prev Vet Med.114, 259–66.
5. Gaull GE. 1989.”Taurine in pediatric nutrition: review and update”. Pediatrics. 83:433–42.
6. Korhonen HJ. 2013.”Production and properties of health-promoting proteins and peptides from bovine colostrum and milk”. Cell Mol Biol. 59, 12–24.
7. Lamarre SG, Edison EE, Wijekoon EP, Brosnan ME, Brosnan JT. 2010. “Suckling rat pups accumulate creatine primarily via de novo synthesis rather than from dam milk”. J Nutr.140,1570–3.
8. Linzell JL, Mepham TB. 1969. “Mammary metabolism in lactating sows: arteriovenous differences of milk precursors and the mammary metabolism of [14C] glucose and [l4 C]acetate” Br J Nutr. 23,319–32.
9. O’Neill LA. 2015 “A broken krebs cycle in macrophages”. Immunity. 42,393-4.
10. Schlimme E, Martin D, Meisel H. 2000. “Nucleosides and Nucleotides: natural bioactive substances in milk and colostrum”. Br J Nutr. 84, 59–68.
11. Van Niekerk BD, Reid JT, Bensadoun A, Paladines OL. 1963. ”Urinary creatine as an index of body composition”. J Nutr.79,463–73.
12. Zou S, McLaren DG, Hurley WL. 1992. “Pig colostrum and milk composition: comparisons between Chinese Meishan and US breeds”. Livest Prod Sci. 30, 115–27.

PREMIO
GIOVANI LAUERATI

PROFILI DI ANTIBIOTICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *SALMONELLA* SPP. ISOLATI NELLA FILIERA SUINA

ANTIBIOTIC- RESISTANCE PROFILES OF *SALMONELLA* SPP. STRAINS ISOLATED FROM THE SWINE CHAIN

TORREGGIANI C., PROF. BRINDANI F.[1], DOTT.SSA BACCI C.[1]

[1]*Università degli studi di Parma, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie*

Parole Chiave: antibiotico-resistenza, Salmonella, suini
Key words: antibiotic-resistance, Salmonella, swine

RIASSUNTO

In questo lavoro si è indagato sulla presenza di *Salmonella* spp. nel suino e sulle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati. L'obiettivo è stato quello di fornire ulteriori dati in merito ai profili fenotipici e genotipici di resistenza in ceppi di *Salmonella* spp. isolati da suini allevati e macellati nella regione Lombardia in provincia di Cremona.

La maggiore preoccupazione riguardo al fenomeno dell'antibiotico-resistenza è rivolta agli agenti appartenenti alle categorie dei fluorochinoloni e cefalosporine, sostanze presenti nella lista critica elaborata dall'OMS. In questo studio *Salmonella* spp. è stata rilevata nel 10% dei campioni ottenuti dalle carcasse suine. L'analisi del profilo fenotipico dei ceppi isolati è preoccupante: 4 antibiotici, corrispondenti al 28,6% degli agenti testati, sono risultati inefficaci. Gli antibiogrammi eseguiti per la ricerca di resistenze verso le cefalosporine di III e IV generazione su isolati di *Salmonella* spp. non hanno mostrato nessuna resistenza e i ceppi non sono risultati produttori di ESβL. Anche le prove biomolecolari condotte mediante l'uso della RT-PCR non hanno evidenziato la presenza del gene CTX-M in alcun isolato di Salmonella. Oggi la resistenza batterica ad antibiotici rappresenta un problema globale che va affrontato in una logica collaborativa ispirata al concetto di "One-Health", ovvero la salute umana e/o animale va tutelata senza settorialismi e senza prescindere dal contesto ambientale.

ABSTACT

In this work we investigated the presence of *Salmonella* spp. in the pig and on the antibiotic-resistance characteristics of the isolates. The aim was to provide further data on phenotypic and genotypic resistance profiles in Salmonella spp. isolated from pigs reared and slaughtered in the Lombardy region in the province of Cremona.

The main concern regarding the antibiotic-resistance phenomenon is directed to the agents belonging to the categories like fluoroquinolones and cephalosporins, substances present in the critical list elaborated by the WHO. In this study Salmonella spp. was detected in 10% of samples obtained from pig carcasses. The analysis of the phenotypic profile of the isolated strains is serious: 4 antibiotics, corresponding to 28.6% of the tested agents, were ineffective. The antibiograms performed for the detection of resistance to cephalosporins of III and IV generation on Salmonella spp. isolates showed no resistance and the strains were not ESβL producers. Biomolecular tests conducted using RT-PCR also did not show the presence of the CTX-M gene in any Salmonella isolate. Today, bacterial resistance to antibiotics represents a global problem that must be tackled in a collaborative logic inspired by the concept of "One-Health", that is to say human and animal health must be protected without sectarianism and without regard to the environmental context.

INTRODUZIONE

Salmonella spp. è uno dei patogeni più largamente coinvolti nelle gastroenteriti umane di origine alimentare: le carni suine e i prodotti derivati sono responsabili della maggior parte delle malattie trasmesse da alimenti a livello mondiale. I suini sono considerati serbatoio di *Salmonella* e possono eliminare il batterio nell'ambiente attraverso le feci, anche in assenza di sintomi; questo fenomeno, da un lato porta ad una incontrollata dispersione del microrganismo negli allevamenti, dall'altro è alla base delle contaminazioni delle carcasse e quindi degli alimenti poiché è possibile una cross contaminazione dovuta alla presenza di animali eliminatori avviati alla catena di macellazione in quanto asintomatici. (D.M. Bianchi et al., 2007). Dai report annuali diffusi dal Sistema Entervet emerge che in generale i suini sono la specie più coinvolta negli isolamenti di *Salmonella* spp. (28,41% nel 2005) seguiti dai polli (25,65% nel 2005). I sierotipi identificati tra gli isolati da suini sono S. Typhimurium (29%), S. Derby (23%) e il sierotipo monofasico 4,5,12:i:- (13%); inoltre, a confermare che la contaminazione degli alimenti ha origine in allevamento gli stessi sierotipi, seppur con piccole variazioni percentuali, sono i più isolati da matrici alimentari di origine suina. L'antibiotico-resistenza è attualmente considerata uno dei più gravi problemi di sanità pubblica a livello mondiale: il trend rilevato è di un continuo aumento dell'antibiotico-resistenza in oltre un terzo dei Paesi europei negli ultimi anni, e un aumento delle percentuali di ceppi produttori di beta-lattamasi ad ampio spettro (ESBL). Viene segnalata inoltre, un'alta percentuale di antibiotico-resistenza tra i batteri Gram negativi, sottolineando la continua perdita di efficacia delle terapie e la necessità di una strategia condivisa su più fronti. La comunità scientifica internazionale è concorde nel sostenere la necessità di misure che portino ad uso corretto e razionale degli antimicrobici, ritenendo l'uso inappropriato degli stessi, un motivo di accelerazione del fenomeno.

In questo lavoro si è indagato sulla presenza di *Salmonella* spp. nel suino, animale che comunemente vive a stretto contatto con l'uomo e sulle caratteristiche di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati. Nell'ambito delle scienze mediche, un tema di cruciale importanza è quello del fenomeno dell'antibiotico-resistenza, questo lavoro si inserisce in questo ambito, con l'intento di fornire ulteriori dati in merito ai profili fenotipici e genotipi di resistenza in ceppi di *Salmonella* spp. isolati da suini allevati e macellati nella regione Lombardia in provincia di Cremona.

MATERIALI E METODI

Nel periodo tra agosto 2016 e febbraio 2017 sono stati prelevati 100 campioni da carcasse di suino provenienti da allevamenti intensivi della provincia di Cremona. L'attività di campionamento è stata condotta durante il periodo di tirocinio, svolto presso il laboratorio di Microbiologia dell'U.O. di Ispezione degli Alimenti di origine animale del Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie.

Per il metodo di campionamento (non distruttivo) si è fatto riferimento alla norma UNI EN ISO 17604:2015, come previsto dal Reg. CE 2073 del 2005 e smi, Allegato I Cap. 3. Le indicazioni relative ai siti di prelievo, alla conservazione e al trasporto dei campioni sono quelle previste dalle norme cogenti, come riportato in seguito. Per il campionamento sono state utilizzate spugne abrasive imbevute con 10 ml di soluzione sterile e contenute in appositi sacchetti (SaniSponge, VWR Chemicals, Italia). Sono state campionate, in ogni sessione di campionamento, 5 carcasse prima del raffreddamento, nelle parti della carcassa previste dal Regolamento CE 2073 del 2005 e smi (lombo, guanciale, faccia mediale della coscia e pancetta). La superficie da campionare è stata identificata da un delimitatore monouso.

La spugna sterile è stata passata più volte in senso orizzontale e in senso verticale sulla superficie delimitata, per un totale di 400 cm^2. Al termine del prelievo la spugnetta è stata riposta nel proprio sacchetto ed è stato aggiunto il terreno di pre-arricchimento specifico per la ricerca di *Salmonella* spp. (Buffered Peptone Water BPW, Biolife Italiana, Italia), fino a un volume totale di 25 ml. Il sacchetto è stato chiuso ermeticamente, identificato e

inviato al laboratorio a una temperatura di trasporto di +8 °C +/- 2°C.

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata condotta applicando la procedura prevista dalla norma UNI ISO 6579:2008, in relazione ai campioni raccolti dalle carcasse.

Fase di pre-aricchimento: In ciascun sacchetto contenente le spugne utilizzate per il campionamento delle carcasse, sono stati aggiunti 225 ml di BPW, in modo da ottenere una diluizione del campione di 1:10. In seguito i sacchetti sono stati incubati in un termostato a 37°C per circa 18 h +/- 2 h.

Fase di arricchimento: Dai sacchetti, è stato prelevato 0,1 ml di brodocoltura (mediante l'uso di un pipettatore sierologico con puntale sterile) ed è stato trasferito in una provetta contenente 10 ml del brodo di arricchimento Rappaport-Vassiliadis (RVB; Rappaport Vassiliadis Broth, Biolife Italiana, Italia), successivamente incubata a 41,5° +/- 1°C per 24 h.

Sempre mediante pipettatore sierologico con puntale sterile, è stato prelevato 1 ml di brodocoltura dai sacchetti ed è stato trasferito in provette contenenti 10 ml del brodo di arricchimento Muller-Kauffman Tetrathionate (MKTT, Biolife Italiana, Italia) ed in inseguito incubata a 37 °C per 24 h.

Semina in piastra con terreno selettivo: Dai due brodi di arricchimento (RVB e MKTT) sono stati prelevati 10 µl, mediante un'ansa sterile monouso, e sono stati seminati su piastre con terreni selettivi per *Salmonella* spp. E' prevista la semina di ogni provetta di RV e di MKTT su due terreni selettivi. Il primo terreno utilizzato previsto dalla norma UNI ISO 6579:2008 è stato lo Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD agar) (Xld) Agar Iso Formulation, Biolife Italiana, Italia). Il controllo di produttività è stato fatto mediante il ceppo ATCC 13076 (*S*. Enteritidis).

Il secondo terreno selettivo da noi scelto è stato il Chromogenic Salmonella Agar (CSA) (Chromogenic Salmonella Agar, Biolife Italiana, Italia). Tutte le piastre sono state incubate in termostato a 37 °C overnight. Il controllo di produttività è stato fatto mediante il ceppo ATCC 14028 (*S*. Typhimurium).

Dopo il passaggio in termostato, tutte le piastre sono state valutate per evidenziare la presenza di colonie con caratteristiche tipiche per *Salmonella* spp. e ben isolate. Le colonie sospette e isolate sono state sottoposte a prove di conferma biochimica mediante semina su terreni specifici, come previsto dalla norma ISO 6579:2008: Urea Agar Base, Lysine Iron Agar e Triple Sugar Iron Agar. I terreni sono stati incubati a 37°C overnight.

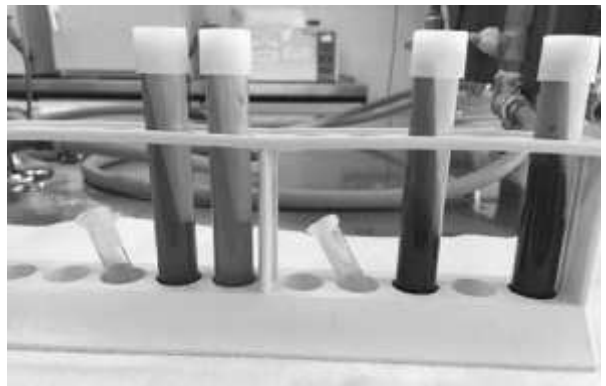


Figura 1: Provette contenenti i terreni utilizzati per le prove biochimiche per la ricerca di Salmonella spp., a sinistra non seminati e a destra come appaiono dopo la semina e l'incubazione overnight: Urea Agar Base (o Urea di Christensen), Lysine Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar (foto dell'autore).

Figure 1: *Tubes containing the media used for biochemical tests for Salmonella spp., Left uncultivated and right as they appear after sowing and overnight incubation: Urea Agar Base (or Christensen's Urea), Lysine Iron Agar, Triple Sugar Iron Agar (photo of the author).*

Dopo l'incubazione, le prove biochimiche di ciascuna colonia sono state valutate in base alle variazioni delle caratteristiche dei terreni utilizzati in caso di sospetta presenza di *Salmonella* spp. Per confermare ulteriormente l'appartenenza di una colonia al genere *Salmonella* viene eseguita una prova con siero polivalente anti-antigene O.
I campioni, positivi per *Salmonella* alle prove precedentemente descritte, sono stati seminati su piastre di terreno nutritivo di base, il Tryptic Soy Agar (TSA) (Tryptic Soy Agar, Biolife Italiana, Italia), e incubate a 37° C per 24 ore. In seguito è stata prelevata una colonia isolata ed è stata sottoposta a ulteriore conferma mediante microgallerie biochimiche, specifiche per *Enterobacteriaceae,* seguendo le istruzioni della ditta produttrice (API 20E®, bioMérieux S.p.A., Francia).
Le colonie identificate come *Salmonella* spp. sono state sottoposte alla ricerca di resistenze antibiotiche verso cefalosporine di III e IV generazione. Il metodo che è stato utilizzato, previsto dalla Commissione Europea per i test di sensibilità antibiotica (EUCAST), è l'agar diffusione con dischetto o test di Kirby Bauer. abbiamo depositato i dischi di antibiotico (Cefotaxime 30 µg; Cefotaxime 30µg+ Clavulanato 10 µg; Ceftazidime 30 µg; Ceftazidime 30g + Clavulanato 10 µg; Cefepime 30 µg; Cefepime 30 µg + Clavulanato 10 µg) premendoli sulla superficie dell'agar. Le piastre sono state incubate a 37°C in atmosfera aerobica per 18 +/- 2h. Alle piastre è stato aggiunto un dischetto di Amoxicillina associata a clavulanato (20 µg+ 10 µg). I campioni identificati come *Salmonella* spp. sono stati sottoposti a prove di resistenze antibiotiche mediante valutazione della concentrazione minima inibente (MIC). Per l'esecuzione sono state utilizzate piastre con micropozzetti precaricati con antibiotici prediluiti. Gli antibiotici sono stati scelti sulla base dei pannelli proposti da EUCAST (Piastre SENSITITRE, Trek Diagnostic System). Gli antibiotici testati sono stati: sulfametossazolo, trimethoprim, ciprofloxacina, tetraciclina, meropenem, azitromicina, acido nalidixico, cefotaxime, cloramfenicolo, tigeciclina, ceftazidime, colistina, ampicillina, gentamicina. Per validare ogni test sono stati utilizzati controlli negativi e positivi nei pozzetti corrispondenti.
Indagini biomolecolari: Il DNA è stato estratto come descritto da (Lakshmi, 2012). Il DNA estratto è stato sottoposto a Real Time PCR (RTq-PCR) usando specifici primer, descritti da Roschanski N. nel 2014.

RISULTATI

La presenza di *Salmonella* spp. è stata rilevata in 10 campioni su 100 (10%), ottenuti sia dalle carcasse suine. Gli antibiogrammi eseguiti sulle colonie isolate di *Salmonella* spp. per la ricerca di resistenze di cefalosporine di III e IV generazione, mediante produzione di beta-lattamasi a spettro esteso non hanno evidenziato la presenza di resistenze verso gli antibiotici testati.
I ceppi identificati come *Salmonella* spp. sono stati sottoposti a prove di resistenze antibiotiche mediante valutazione della concentrazione minima inibente (MIC). Il test ha mostrato resistenze variabili nei confronti degli antibiotici testati.
Tutti gli isolati di *Salmonella* spp. hanno mostrato resistenza ai seguenti antibiotici: Sulfametossazolo (SMX), Ampicillina (AMP) e Gentamicina (GEN). Otto isolati di salmonella su 10 (80%) testati hanno mostrato resistenza al Trimethoprim (TMP) e 8 (80%) sono risultati resistenti alla Ciprofloxacina (CIP).
La resistenza verso la Tetraciclina (TET) è stata rilevata in sei ceppi microbici sui dieci testati (60%). La resistenza verso l'Azitromicina (AZI) è stata riscontrata in 4 salmonelle (40%).
Sono state testate mediante Minima Concentrazione Inibente (MIC) sia il Cefotaxime (FOT) sia il Ceftazidime (TAZ): per il primo antibiotico solo due ceppi isolati (20%) sono risultati resistenti (4 g), mentre per il Ceftazidime non si sono riscontrate resistenze.
Gli isolati da sette campioni sono risultati resistenti all'Acido Nalixidico (70%). Nessuna salmonella isolata dai campioni ha mostrato resistenza verso il Meropenem (MERO).

Sei ceppi sui dieci testati (60%) hanno mostrato resistenza a Cloramfenicolo (CHL) e il 50% (cinque su dieci) è risultato resistente alla Tigeciclina (TGC). Nove isolati (90%) hanno mostrato resistenza verso la Colistina (COL).
Le indagini condotte con biologia molecolare non hanno rilevato la presenza del gene ESBL CTX-M in nessun ceppo isolato.

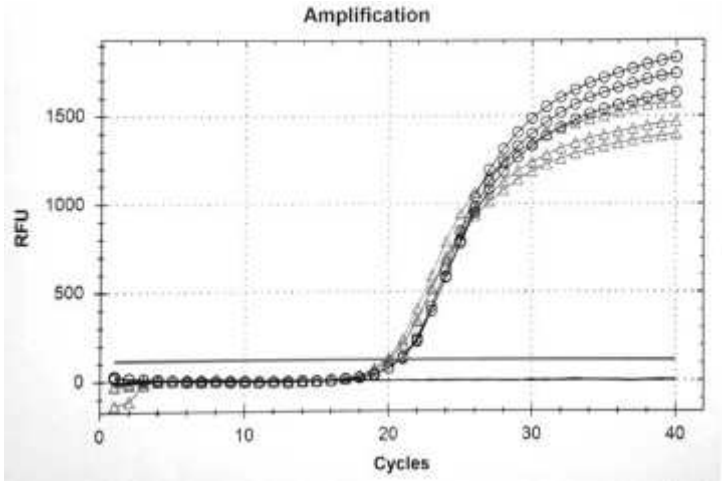


Figura 2: Indagini biomolecolari condotte con RTq-PCR sul gene CTX-M. Controlli positivi (rosso e blu), controllo negativo (nera)
Figure 2: *Biomolecular investigations conducted with RTq-PCR on the CTX-M gene. Positive controls (red and blue), negative control (black)*

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'analisi del profilo fenotipico di antibiotico-resistenza dei ceppi isolati è preoccupante: 4 antibiotici sono risultati inefficaci, nella fattispecie si tratta del 28,6% degli agenti testati, mentre i restanti farmaci hanno rivelato una efficacia variabile.
In particolare, tutti i campioni sono risultati resistenti ad almeno un agente antimicrobico. Questo dato manifesta la crescente dimensione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Nel 2000 Threlfall e altri autori consideravano il 35,2% dei ceppi resistenti ad almeno un farmaco, percentuale cresciuta, cinque anni più tardi, al 40,8% (Gill et al., 2005).
Il report dell'attività di EFSA-ECDC del 2011 segnala che i profili di resistenza espressi da salmonelle da fonte umana sono principalmente rivolte verso le tetracicline (27.1%), seguite dall' ampicillina (26.6%).
Il problema dell'antibiotico-resistenza è dunque un tema comune alla medicina veterinaria ed umana, tanto più preoccupante quanto più frequenti si fanno le segnalazioni delle multiresistenze (Rapporto EFSA-ECDC 2011). Il report dell'EFSA-ECDC sulla resistenza agli antibiotici in batteri zoonotici, che analizza i dati raccolti nel 2013, conferma che le possibilità di trattare le "food borne diseases" stanno diminuendo, poiché alcuni batteri continuano a manifestare resistenza ai farmaci antimicrobici.
I risultati di questo studio confermano che il fenomeno dell'antibiotico-resistenza è un problema molto rilevante in Italia che merita l'applicazione di misure atte a prevenirne l'aumento e mettono l'accento sull'importanza di sviluppare l'uso consapevole e prudente degli antimicrobici in medicina veterinaria.
Questo studio mette in evidenza il fenomeno della multifarmacoresistenza, ovvero la

resistenza a più antibiotici, in linea con altri studi effettuati in ambito italiano ed europeo. Dal confronto con gli esiti del rapporto di EFSA ed ECDC del 2017, emerge una distinzione con i risultati della presente ricerca, particolarmente per un aspetto: i ceppi di *Salmonella* spp. da noi testati, mostrano, infatti, una maggiore resistenza a colistina; mentre, dal rapporto di EFSA ed ECDC è stata riscontrata resistenza alla colistina a livelli molto bassi sia in *Salmonella* spp. che in *E. coli,* presenti in suini e bovini.

Gli esiti della presente ricerca associati alla scoperta del nuovo meccanismo di resistenza alla colistina nei batteri, causato dal gene MCR-1, inducono a pensare che, per ridurre questo fenomeno, l'utilizzo dell'antibiotico per uso veterinario andrebbe ridimensionato. A proposito di questo, bisogna ricordare che il 05/08/2016 il Ministro della Salute ha diramato la nota n. protocollo DGSAF 18992-P sull'uso responsabile della colistina in relazione al fenomeno della AMR. Il DM del 25/08/2016 ha poi decretato che la colistina è fosse ritirata dal commercio.

La presenza di *Salmonella* spp. nella filiera suina fornisce indicazioni utili sull'utilizzo di buone pratiche di gestione del sistema di autocontrollo adottato.

Per potere ridurre il numero di casi di salmonellosi umana bisognerebbe attuare delle misure preventive atte a garantire l'assenza di *Salmonella* negli allevamenti dei suini da riproduzione e nei mangimi loro somministrati, pulizia e disinfezione adeguate degli allevamenti, assenza di contaminazione durante la macellazione delle carcasse e misure di biosicurezza. Infine, bisognerebbe evitare lo stress degli animali, ad esempio agendo accuratamente sul loro trasporto dall'allevamento di origine al macello. Il tema della resistenza antimicrobica è altamente rilevante ad oggi, pertanto questo studio fornisce solamente ulteriori dati sul fenomeno dell'A-R correlati alla filiera suina. Questi saranno poi approfonditi da indagini di tipo genotipico, al fine di migliorare la comprensione di un fenomeno estremamente complesso e di difficile risoluzione.

BIBLIOGRAFIA

1. Bianchi D.M., Gallina S., Sona B., Gennero M.S., Masoero L., Belvedere M.A., Decastelli L., *Salmonella nell'allevamento e nella filiera alimentare suina: indagine di prevalenza microbiologica e sierologica*, Large Animal Review, 2007, 13: 261-265
2. Gill., N., Reilly, B., Threlfall, J.,. *Surveillance of Enteric Pathogens in Europe and Beyond,* Enter-Net Annual report 2005, DGSANCO Unit C/3, Agreement N°2003203, pp-22-30
3. Lakshmi C., Revell P.A., *Prevalence and molecular characterization of extended-Spectrum-Beta-Lactamase producing Enterobacteriaceae ina a pediatric patient poulation*, Antimicrobical Agent of Chemotherapy, Vol. 56, N.), 2012, pp. 4765-4770
4. Martelli P. et al *, Le Patologie del maiale,* le point veterinaire italie, 2013

RIDUZIONE DEL DOLORE IN SUINETTI SOTTOPOSTI A CASTRAZIONE: VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DELLA SOMMINISTRAZIONE DI UN ANESTETICO LOCALE E DI UN ANTI-INFIAMMATORIO

PAIN REDUCTION IN CASTRATED PIGLETS: EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A LOCAL ANAESTHETIC AND AN ANTI-INFLAMMATORY ADMINISTRATION

BOLZONELLO M.[1], SCOLLO A.[2,3], GOTTARDO F.[3], CONTIERO B.[3], DE BENEDICTIS M.G.[3]

[1]Medico Veterinario, Gorzagri s.s; [2]Medico Veterinario, Swivet Research snc; [3]Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Parole chiave: Castrazione, Analgesia, Anestesia Locale

***Key words*:** Castration, Pain relief, Local Anesthesia

RIASSUNTO: Attualmente la castrazione chirurgica dei suinetti è una pratica piuttosto diffusa in tutta Europa sebbene ne sia comprovata la dolorosità. Lo studio ha avuto come principale obiettivo quello di valutare l'efficacia di un farmaco antiinfiammatorio non-steroideo, di un anestetico locale e della loro associazione nella riduzione del dolore alla castrazione. La sperimentazione ha considerato 252 suinetti maschi appartenenti a 50 nidiate, in ognuna delle quali 5 suinetti maschi sono stati assegnati ai seguenti trattamenti sperimentali: manipolato-H, castrato-C, castrato+antiinfiammatorio-M, castrato+anestetico locale-A, castrato con antiinfiammatorio+anestetico locale-AM. I trattamenti H e C fungono da controlli rispettivamente positivo e negativo. Per valutare l'effetto analgesico sono state effettuate tre misurazioni del cortisolo ematico (prima della castrazione, a 60 e 180 minuti) e tre rilevazioni della soglia nocicettiva ad uno stimolo pressorio prodotto da un algometro (tra 0-20, 60 e 180 minuti). In parallelo sono state effettuate delle rilevazioni comportamentali che hanno considerato la latenza al movimento e alla poppata dalla castrazione. Analizzando il cortisolo si è osservato un picco a 60 minuti in tutti i trattamenti che prevedevano la castrazione, il valore più elevato si è registrato per il gruppo A, intermedio per C e sostanzialmente simile per M ed AM. A tre ore dalla castrazione invece non si sono riscontrate differenze significative. Per quanto riguarda l'algometro, i gruppi C ed A mostrano una sensibilità lievemente maggiore. Dal punto di vista comportamentale i suinetti del gruppo M passano meno tempo distesi e nell'area del nido, sono più veloci a tornare alle mammelle della scrofa e manifestano minori segni di dolore e sfregamento dell'area scrotale. In conclusione i risultati suggeriscono che l'utilizzo dell'analgesico può portare dei benefici ai suinetti nella riduzione del dolore alla castrazione.

ABSTRACT: Currently the surgical castration of piglets is a diffused practice in Europe even if its painfulness is proven. This study aims to evaluate the effectiveness of an anti-inflammatory non-steroidal drug, of a local anesthetic and of their association in the pain reduction caused by castration. This study considered overall 252 male piglets belonging to 50 litters, in each of these 5 male piglets have been assigned to the following experimental treatments: manipulated-H, castrated-C, castrated+meloxicam-M, castrated+local anaesthetic-A, castrated+meloxicam+local anaesthetic-AM. The treatments H and C are considered as positive and negative controls. Three measurements of the blood cortisol were performed to evaluate the analgesic effect (before the castration, at 60 and 180 minutes) and three surveys of the nociceptive threshold to a pressor

stimulus produced by an algometer (among 0 and 20, at 60 and 180 minutes after castration). At the same time there have been effected some post castration behavioral surveys that have considered the latency to the movement and to feed at the sow udders from castration. Analysing the cortisol concentration it has been seen a peak at 60 minutes in all the treatments that forecasted the surgery, the highest value was recorded for group A, an intermediate one for the castrated C and a substantially similar one for M and AM. At 3 hours from castration no significative differences have been found. Regarding the recorded values with the algometer, groups C and A have shown a sensitiveness slightly greater than M and AM. From the behavioral point of view the piglets of the M group spend less time stretched around the area of the nest, are faster to return to the udders of the sow and show less signs of pain and rubbing of the scrotal area. In conclusion, the results suggest the use of analgesic can bring benefits to piglets in the reduction of pain in castration.

INTRODUZIONE

Ogni anno in tutta Europa più di 100 milioni di suini subiscono la castrazione chirurgica entro i sette giorni di vita in accordo con quanto sancito dalla Direttiva Europea 120/2008 sulle "Norme minime per la protezione dei suini". Questa pratica è effettuata allo scopo di prevenire la formazione del caratteristico odore di verro nelle carni dei suini maschi che raggiungono la pubertà. Essa viene attuata nella maggior parte dei casi senza l'utilizzo di anestetici o antiinfiammatori.

Proprio in questo contesto si stanno sollevando delle forti critiche da parte dell'opinione pubblica, sempre più sensibile ed attenta al benessere animale, i cui principi sottolineano l'importanza di evitare loro ogni tipo di sofferenza. È proprio riguardo alla problematica della castrazione che l'unione europea si è mossa stipulando nel 2010 la "Dichiarazione europea sulle alternative alla castrazione chirurgica dei maiali" lasciando comunque una deroga per le produzioni tradizionali che possiedano i marchi DOP/IGP, per i quali la castrazione è inevitabile per raggiungere i corretti standard qualitativi, come per il suino pesante (160 kg, 9 mesi). La castrazione chirurgica dei suinetti in Italia non prevede al momento alternative sostenibili come ad esempio la castrazione immunologica o la macellazione a pesi inferiori. Ecco dunque che questo studio nasce allo scopo di testare l'efficacia di un protocollo anestesiologico ed analgesico nella riduzione del dolore inflitto alla castrazione.

MATERIALI E METODI

Nello studio sono state prese in considerazione complessivamente 50 nidiate per effettuare tutti i rilievi sperimentali, per un totale di 252 suinetti maschi, considerando che le rilevazioni comportamentali non sono state effettuate su nidiate utilizzate per la valutazione della cortisolemia e il test tramite algometro. La scelta della nidiata si è basata sulle seguenti caratteristiche: età dei suinetti compresa tra i 4 e i 6 giorni, numero minimo di 5 suinetti maschi per nidiata, i suinetti non dovevano presentare ernie, testicoli ritenuti o segni di altre patologie in atto ed infine le nidiate dovevano presentare una certa omogeneità di peso. Per identificare i suinetti ed il relativo trattamento è stato utilizzato un gesso colorato atossico, numerando i soggetti da 1 a 5. Tutti i trattamenti sperimentali considerati nello studio sono riassunti nella tabella 1. Per ogni nidiata sono stati eseguiti tutti e 5 i trattamenti su 5 suinetti: manipolato-H, castrato-C, castrato+anestetico locale-A (procaina cloridrato 40 mg/ml ed adrenalina tartrato 0,036 mg/ml), castrato+antiinfiammatorio (meloxicam 0,4 mg/kg), castrato+anestetico locale ed antiinfiammatorio. Inoltre per cercare di ridurre la variabilità delle osservazioni e dei risultati le procedure sono state eseguite sempre dagli stessi operatori. In particolare queste procedure sono state: prelievo di sangue per la determinazione della concentrazione del cortisolo ematico (prima della castrazione, a 60 e 180 minuti), misurazione della soglia nocicettiva ad uno stimolo pressorio prodotto da un algometro (prima della castrazione, tra 0 e 20, a 60 e a 180 minuti) e

rilievi comportamentali. Un riassunto delle tempistiche e del numero dei soggetti impiegati è riportato in Tabella 2. Le osservazioni comportamentali iniziavano subito dopo la castrazione e si estendevano per un'ora durante la quale veniva registrata l'attività e la posizione dei suinetti ogni tre minuti. Le attività svolte durante lo studio sono state registrate per posizione e attività, in un secondo momento suddivise in comportamenti non specifici: tempo di decubito, presenza nell'area del nido e stazione; e comportamenti specifici associati a dolore: tremori, grattamento, posizione a "cane seduto", sfregamento dell'area scrotale e l'inarcamento della schiena.

Tabella 1: Elenco dei trattamenti sperimentali utilizzati nello studio.
Table 1: *List of experimental treatments used in the study*.

	Handling (H)	Castrazione (C)	Castr. +Aticain (0,3ml) (A)	Castr. +Meloxicam (0,2 ml) (M)	Castr.+ Aticain e Melox. (0,3+0,2 ml) (AM)
Somm. per via SC con ago da insulina (10 minuti prima della castrazione)	No	No	Sì	No	Sì
Somm. per via IM con ago da insulina (10 minuti prima della castrazione)	No	No	No	Sì	Sì
Manipolazione al momento della castrazione	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Castrazione	No	Sì	Sì	Sì	Sì
Uso del disinfettante nella regione scrotale post castrazione	No	Sì	Sì	Sì	Sì

Tabella 2: Numerosità dei suinetti impiegati e tempistiche dei rilievi effettuati.
Table 2: *Number of piglets and timing of the measurements made.*

Tipo di rilevazione	Cortisolo	Algometro	Comportamento	Totale
n. nidiate	18	14	18	50
Tipo di rilevazione	Cortisolo	Algometro	Comportamento	Totale
n. suinetti/trattamento	18	14	18A, 17AM, 18C, 18H, 21M	124
n. suinetti totale	90	70	92	252
Tempistica delle rilevazioni rispetto al momento della castrazione:				
• Subito prima	Sì	Sì	No	
• Tra 0 e 20 minuti dopo	No	Sì	Sì	
• Tra 0 e 30 minuti dopo	No	No	Sì	
• 60 minuti dopo	Sì	Sì	No	
• 180 minuti dopo	Sì	Sì	No	

RISULTATI

I prelievi di sangue per la valutazione del cortisolo hanno dimostrato un'interazione significativa tra il fattore trattamento ed il momento del prelievo. A 60 minuti dalla castrazione (t.c.60) il gruppo A manifesta i valori più elevati, seguito da C. Concentrazioni ematiche di cortisolo simili si hanno invece per i gruppi M (FANS-meloxicam) ed AM mentre per il gruppo H si sono riscontrati i valori più bassi. Per quanto riguarda il prelievo a 180 minuti (t.c.180) i valori non presentano differenze significative benché i gruppi H, M ed AM si mantengano su valori lievemente inferiori (tabella 3).

I risultati dell'analisi dei dati raccolti con l'algometro in tre punti dell'area scrotale evidenziano delle differenze significative tra i vari trattamenti: i valori più bassi per i gruppi C ed A, ossia i più sensibili allo stimolo pressorio, intermedi per AM e M e più alti per il gruppo H (tabella 4). Per quanto riguarda l'effetto tempo la risposta è stata differente nei primi 20 minuti dalla castrazione, mostrando valori più elevati, mentre non si è dimostrata essere significativamente differente tra 60 e 180 minuti dalla castrazione (tabella 5). Analizzando i dati comportamentali sia per quanto riguarda il tempo passato in decubito sia per il tempo speso nell'area del nido (tabelle 6-7) si è visto che i suinetti appartenenti al gruppo C hanno i valori più elevati, intermedi per H, A, AM e più bassi per il gruppo M.

Tabella 3: Valori medi del cortisolo sierico (nmol/l) a 60 e 180 minuti dalla castrazione.
Table 3: *Average values for the serum cortisol (nmol/l) at 60 and 180 minutes after castration.*

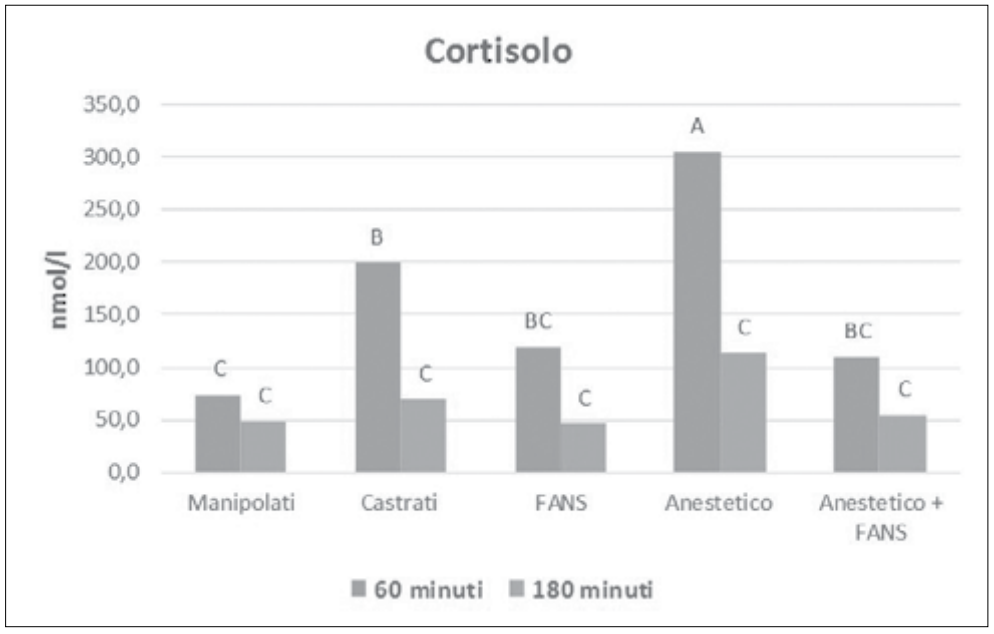


Tabella 4-5: Pressione media applicata tramite algometro per ciascun trattamento alla regione perineale destra, sinistra e centrale/ Pressione media applicata tramite algometro a tre diversi tempi dalla castrazione.
Table 4-5: *Average pressure applicated with algometro for each treatment at the right, left and central perineal region/*
Average pressure applicated with algometro at three different times after castration.

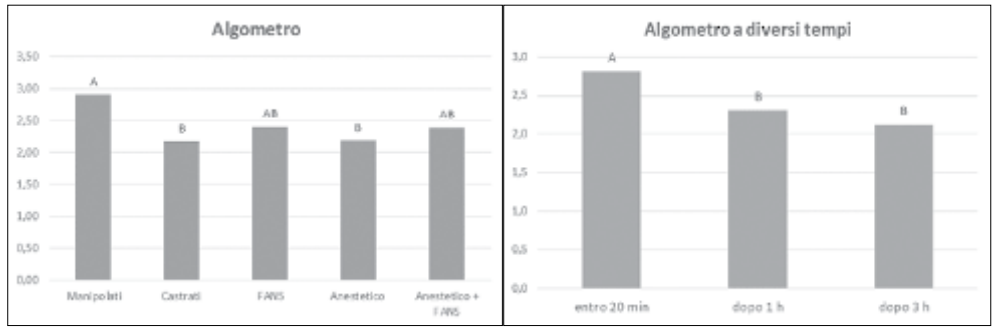


Tabella 6-7: Tempi medi trascorsi in decubito dai suinetti suddivisi per trattamento/ Tempi medi trascorsi nell'area del nido dai suinetti suddivisi per trattamento.
Table 6-7: *Average time spent by piglets lying down divided for treatments/ Average time spent by piglets in the nest area divided for treatments.*

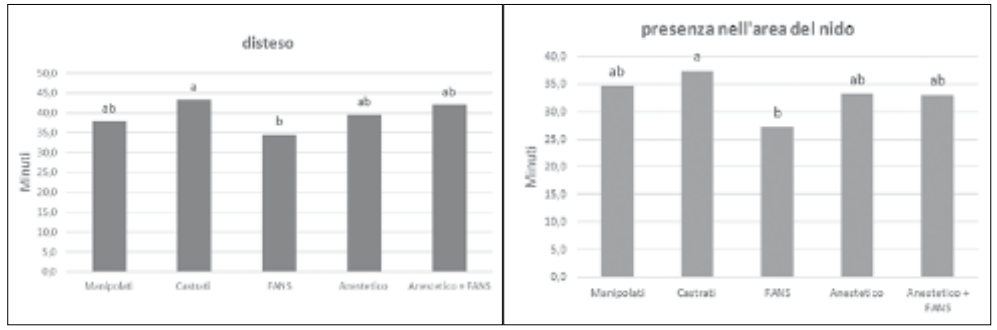
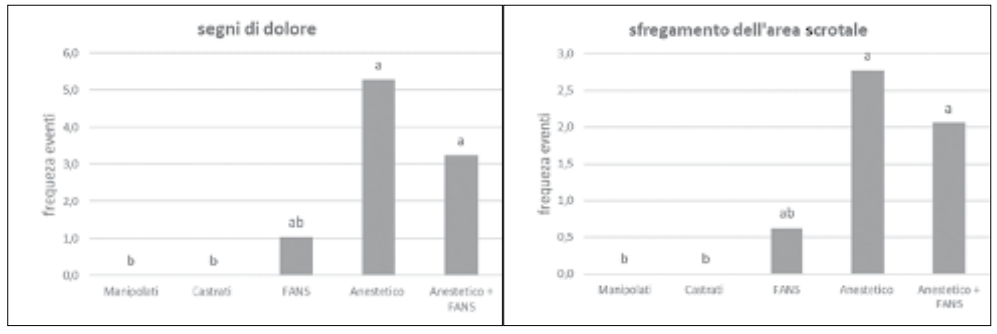


Tabella 8-9: Frequenza dei segni di dolore suddivisa per trattamento/ Frequenza dello sfregamento dell'area scrotale suddivisa per trattamento.
Table 8-9: *Frequency of pain scores for each treatment/ Frequency of rubbing the scrotal area for each treatment.*



DISCUSSIONE

Analizzando i risultati, si può notare come la concentrazione maggiore di cortisolo si abbia a 60 minuti dalla castrazione mentre a 180 minuti tutti i valori si abbassino e non mostrino differenze significative, indicando che la procedura causa un dolore acuto, in accordo con lo studio di altri autori (A. Prunier, A.M. Mounier, and M. Hay, 2005; Prunier et al, 2006). Tra i gruppi valutati ad un'ora dalla castrazione, quello con i valori più alti è stato il gruppo con i suinetti trattati con l'anestetico locale (A), contrariamente alla logica dato che il gruppo C, secondo per livello di cortisolemia, non prevedeva alcun trattamento; ragionevolmente si potrebbe pensare che i suinetti di questo gruppo provino un dolore maggiore rispetto agli altri gruppi tesi. Ipoteticamente l'anestetico locale utilizzato, ossia la procaina cloridrato, è un farmaco appartenente al gruppo degli esteri che è noto avere delle possibili reazioni allergiche nel sito di inoculo, causando effetti collaterali come irritazioni cutanee, orticaria, dermatiti, e allergie cutanee nei soggetti predisposti. Spesso al momento dell'inoculazione queste molecole possono causare bruciore a causa del basso pH della soluzione (Waldmann et al, 1994; Zankl et al, 2007). L'associazione della procaina con il meloxicam (FANS) sembra però mascherare lo stimolo dolorifico dato ai suinetti del gruppo AM in quanto la concentrazione di cortisolo è più bassa rispetto alla sola procaina (A). Questo probabilmente è dovuto al fatto che l'utilizzo dell'analgesico meloxicam previene l'attivazione delle cicloossigenasi e quindi di tutta la cascata dei mediatori dell'infiammazione (prostaglandine, trombossani, leucotrieni e la liberazione di istamina), implicati peraltro in possibili reazioni allergiche piuttosto comuni per anestetici locali appartenenti al gruppo considerato nella sperimentazione. I gruppi AM e M hanno evidenziato risultati del tutto simili, ponendo in dubbio il reale vantaggio nell'utilizzo della procaina come anestetico locale in quanto comporta una maggior tempo di manipolazione del suinetto (con le tre iniezioni sottocutanee) ed un maggior costo della procedura. Tutto ciò potrebbe essere giustificato dal fatto che l'anestesia locale può ridurre il dolore superficiale all'incisione dello scroto ma non essere efficace all'atto della trazione del funicolo spermatico posto molto più in profondità (Gottardo et al, 2016). Il gruppo M sembra quindi essere il più simile, vantaggioso e paragonabile al gruppo manipolato (H) in accordo con diversi studi sull'efficacia analgesica del meloxicam (Zols et al. 2006; Langhoff et al. 2009).

I dati ottenuti tramite l'algometro, considerando l'effetto tesi, indicano valori in linea con quanto risultato dal cortisolo, in particolare si nota come il gruppo tesi manipolato (H) sia il meno sensibile alla stimolazione meccanica applicata, in accordo con quanto emerso da altri studi (Gottardo et al., 2016) e con la premessa di base che la regione perineale viene lasciata integra. I gruppi che invece hanno dato risultati intermedi ma comunque più vicini al manipolato (H) sono quelli trattati con l'anti-infiammatorio non steroideo M ed AM, ciò è indice di una reale efficacia dell'analgesico utilizzato. Il gruppo peggiore invece è stato A, con una risposta pressoché identica al gruppo C; pertanto sembrerebbe che l'uso della procaina cloridrato come anestetico locale non sia un trattamento efficace.

Analizzando i valori ottenuti tramite l'algometro in funzione del tempo trascorso dalla castrazione, si può notare come il primo rilievo (t.a.0-20) abbia fornito le soglie di stimolazione meccaniche più alte rispetto a (t.a.60) e (t.a.180), che sono risultati essere sostanzialmente simili e con una maggiore sensibilità alla stimolazione. Questo dato può essere interpretato con il fatto che nel suinetto si assiste al fenomeno della sensibilizzazione, ossia la prima esperienza negativa avuta con l'algometro, che di per sé va a stimolare una regione precedentemente insultata, porta ad una diminuzione della soglia di attivazione dei nocicettori alle stimolazioni seguenti con il risultato che la risposta agli stimoli è aumentata e quindi avviene con pressioni più basse. Inoltre i processi di guarigione delle ferite cutanee per prima intenzione prevedono una notevole attivazione del meccanismo a

cascata dell'infiammazione già dalle prime ore, ciò crea una maggiore sensibilità alla zona ricevente l'insulto (V.Kumar et al, Pathological basis of diseases, Saunders CO., 2005). Le attività svolte durante lo studio sono state registrate per posizione e attività, in un secondo momento suddivise in comportamenti non specifici e comportamenti specifici associati a dolore, originato dalla castrazione chirurgica (Hay et al., 2003). Tra i comportamenti non specifici, sarebbe lecito supporre che i suinetti che provino una sensazione dolorifica manifestino una minore espressione di comportamenti attivi quali camminata e poppata, mentre tendano a manifestare maggiormente comportamenti passivi come il tempo passato distesi, l'isolamento dai propri fratelli, la latenza al movimento (Chaloupkovà et al., 2007) e alla poppata. Per quanto riguarda il tempo passato in decubito e la presenza nel nido i suinetti appartenenti al gruppo dei castrati (C) hanno mostrato i valori più elevati, simili ed intermedi per i gruppi H, A ed AM mentre per il gruppo trattato con l'analgesico (M) i valori sono risultati essere i più bassi. Di conseguenza la posizione in stazione ha manifestato andamento opposto. Nella tabella 8-9 possiamo constatare come i gruppi A ed AM manifestino i maggiori segni di dolore considerati come tremori, grattamenti e la posizione a "cane seduto" assunta dai suinetti. Lo sfregamento dell'area scrotale (tabella 9) rappresenta un altro indicatore di dolore, infatti lo possiamo far rientrare negli atteggiamenti di grattamento. Il fatto che il gruppo C non manifesti i segni di dolore utilizzati nella rilevazione può essere giustificato dal fatto che questi comportamenti sono una diretta conseguenza del trattamento effettuato, ossia è proprio l'anestetico la fonte del problema e non la castrazione di per sé. Infine sebbene dalle rilevazioni del cortisolo ematico e dell'algometro i gruppi M e AM siano sostanzialmente simili e i più vicini al gruppo di controllo positivo, vi sono una serie di fattori comportamentali negativi espressi maggiormente per i suinetti che hanno ricevuto l'anestetico locale sia da solo che in associazione. Il comportamento più indicativo per quest'ultimi è stato lo sfregamento dell'area scrotale che come è stato ricordato in precedenza è dovuto al pH acido della sostanza iniettata. Oltre a ciò va considerato il fatto che l'anestesia locale comporta una manodopera e un costo della procedura maggiori dovuto all'intervento di un medico veterinario.

CONCLUSIONI

Le diverse misurazioni effettuate hanno prodotto dei risultati coerenti tra loro e che in linea generale permettono di affermare che il miglior trattamento è stato quello con il solo analgesico (FANS); questo è in accordo con altri studi presenti in letteratura tra i quali oltre al meloxicam viene considerato anche il ketoprofene un altrettanto valida alternativa. Considerando quindi questi aspetti possiamo ritenere la procaina cloridrato, farmaco appartenente al gruppo degli esteri, non adatta allo scopo prefissato di ridurre il dolore alla castrazione dei suinetti. Sarebbe interessante testare altri tipi di anestetici locali, possibilmente appartenenti al gruppo ammidico di più recente sintesi, associati ad un FANS. Le caratteristiche che deve possedere un buon anestetico sono alta potenza, bassa tossicità, bassa tendenza a provocare effetti sistemici, alta rapidità d'azione e lunga o media durata. La maggior parte di queste sono possedute dalla lidocaina, sostanza molto presente negli studi in letteratura. La problematica principale consiste nel fatto che la lidocaina non è un farmaco registrato per l'utilizzo nel suino e bisogna ricorrere alla deroga. In questa situazione la disponibilità di una più ampia scelta di farmaci registrati per il suino, anche solo per identificare un protocollo di riduzione del dolore alla castrazione efficace, risulta essere di fondamentale importanza. Per far sì che questo accada è necessario l'interesse soprattutto delle case farmaceutiche oltre ovviamente a quello dell'opinione pubblica, dato che la castrazione chirurgica è una tematica che presenta delle efficaci alternative in tutta Europa ma sicuramente meno presenti in Italia, viste le caratteristiche dei prodotti commerciali ottenuti dalla catena del suino pesante.

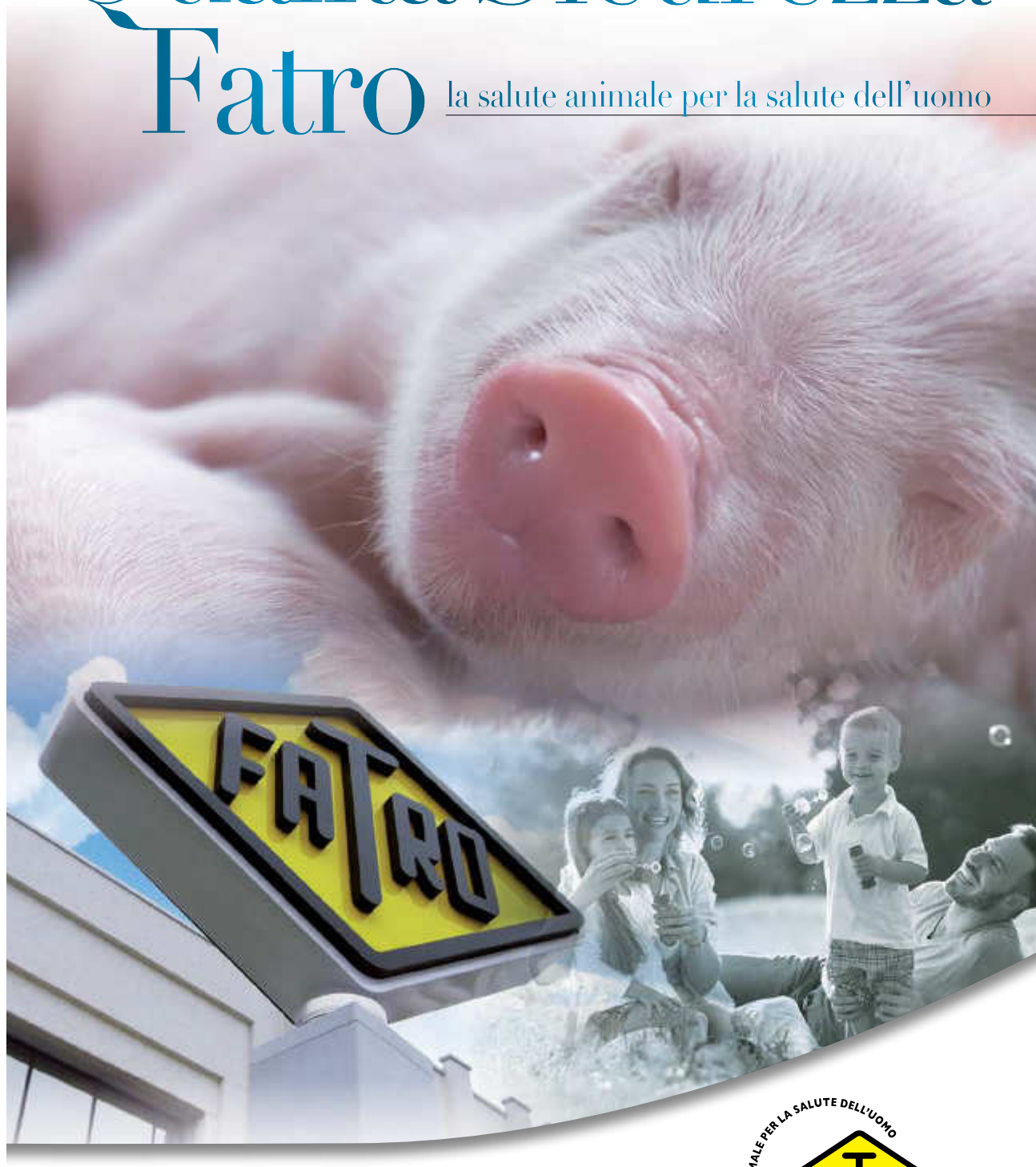
BIBLIOGRAFIA

1. Chaloupková H, Illmann G, Neuhauserová K, Tománek M and Valis L (2007). Preweaning housing effects on behavior and physiological measures in pigs during the suckling and fattening periods. Journal of Animal Science 85, 1741–1749.
2. Direttiva 2008/120/CE del Consiglio del 18 Dicembre 2008, (2008), "Norme minime per la protezione dei suini." Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea L 47 del 18.2.2009.
3. Gottardo F., Scollo A., Contiero B., Ravagnani A., Tavella G., Bernardini D., De Benedictis G.M. e Edwards S.A. (2016). "Pain alleviation during castration of piglets: a comparative study of different farm options". J. Anim. Sci. 94:1-12.
4. Hay M, Vulin A, Genin S, Sales P, Prunier A (2003): Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days. Applied Animal Behaviour Science, 82:201-218
5. Langhoff R., Zöls S., Barz A. et al. (2009). "Untersuchungen über den Einsatz von Schmerzmitteln zur Reduktion kastrationsbedingter Schmerzen beim Saugferkel (Investigation about the use of analgesics for the reduction of castration induced pain in suckling piglets)", Berl Münch Tierärztl Wochenschr; 122:325–332.
6. Prunier A., Mounier A., Hay M. (2005). "Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs". J. Anim. Sci; 83:216–222.
7. Prunier A., Bonneau M., Von Borell E.H., Cinotti S., Gunn M., Fredriksen B., Giersing M., Morton D.B., Tuyttens F.A.M., Velarde A. (2006). "A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and evaluation of non-surgical methods". Animal Welfare, 15:277-289.
8. Waldmann KH, Otto K and Bollwahn W (1994). Ferkelkastration — Schmerzempfinden und Schmerzausschaltung. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 101: 105-109 [Title translation: Castration of piglets — pain and anaesthesia.].
9. V. kumar et al, Pathological basis of diseases, Saunders CO., (2005).
10. Zankl A, Ritzmann M, Zöls S and Heinritzi K (2007). The efficacy of local anaesthetics administered prior to castration of male suckling piglets. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift 114, 418–422.
11. Zöls S., Ritzmann M., Heinritzi K. (2006). "Einfluss von Schmerzmitteln bei der Kastration ma¨nnlicher erkel (Effect of analgesics on castration of male piglets)". Berl Münch Tierärztl Wochenschr; 119:193–196.

Qualità e Sicurezza

Fatro

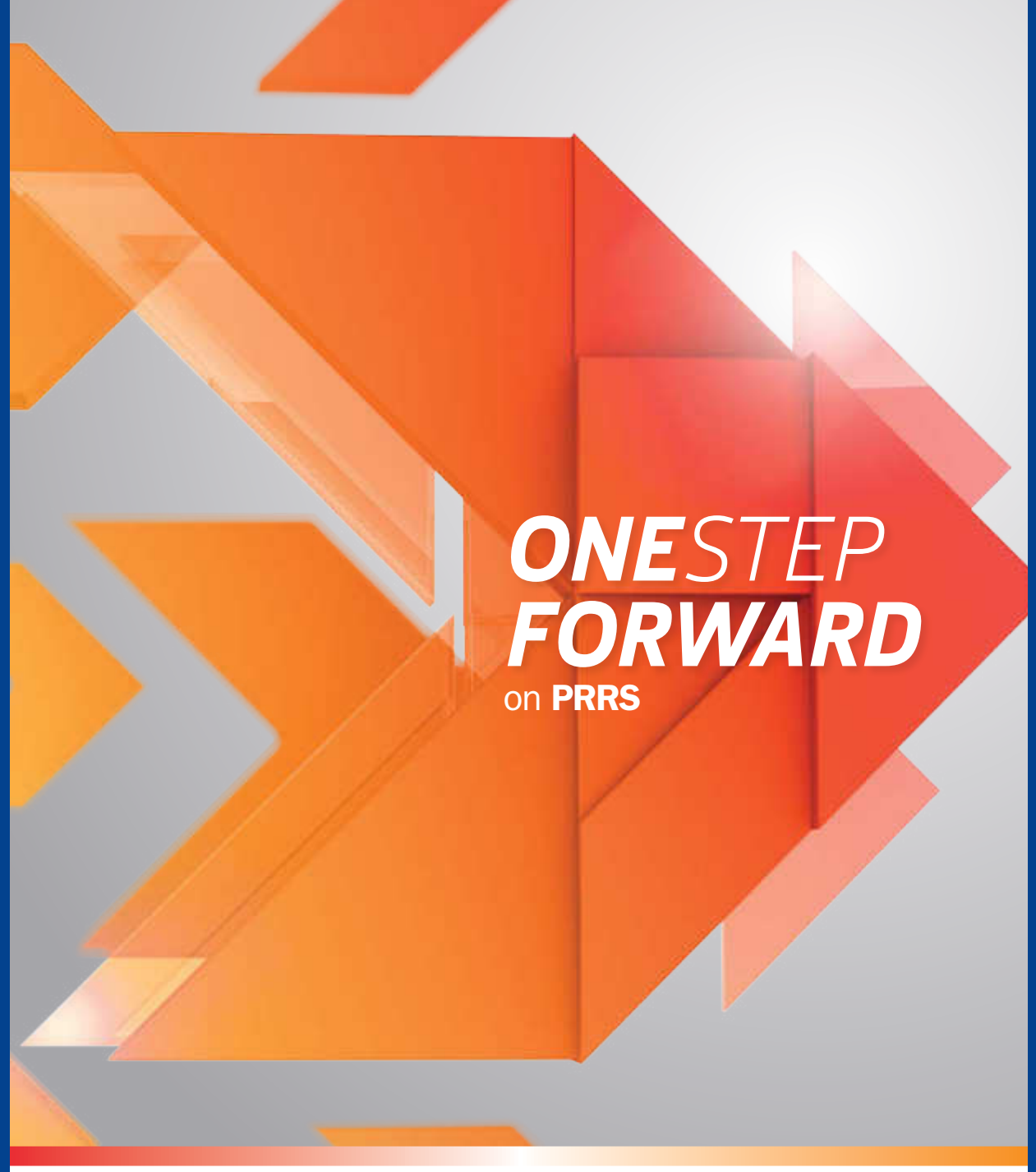
la salute animale per la salute dell'uomo



*La **s**alute **a**nimale per la **s**alute dell'**u**omo*

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

LA SALUTE ANIMALE PER LA SALUTE DELL'UOMO
FATRO


ONESTEP
FORWARD
on PRRS

HIPRA

il Riferimento
nella Prevenzione
in Salute Animale

Hipra Italia, S.R.L. Via Franciacorta n° 74 · 25038 Rovato (Brescia) · Italia
Tel.: (+39) 030 7243 025 · Fax: (+39) 030 7700 881 · italia@hipra.com · www.hipra.com

HUVEPHARMA®
We add performance to your business

www.huvepharma.com

Contatto per l'Italia:
Paolo Mondin: 339/7385156
paolo.mondin@huvepharma.com

HUVEPHARMA EOOD · 3ª 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

MSD
Animal Health
La scienza per animali più sani®

ACCENDI
LA TRIPLA PROTEZIONE

verso le infezioni riproduttive della scrofa.

La più ampia difesa della gestazione è in arrivo!

LIVISTO

50° anniversary
INDUSTRIA ITALIANA INTEGRATORI TREI

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
- Linea vaccini
- 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

Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.
e-mail: trei@treivet.com - Tel: +39 0522 640711
livisto.com

Along with you

VETAGRO®
Like no one else™

L'innovazione è al centro della filosofia Vetagro. Oltre trentacinque anni di attività di ricerca e sviluppo dedicati all'alimentazione animale e allo sviluppo di additivi specie specifici per avicoli, suini e ruminanti, consentono a Vetagro di offrire una vasta gamma di prodotti in grado di migliorare il benessere animale e le performance produttive, con risultati provati in tutto il mondo.

vetagro.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

vetoquinol
ACHIEVE MORE TOGETHER

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 2019
si svolgono con il contributo di: