



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

**XLVI**  
MEETING ANNUALE



Pescantina (VR) - Villa Quaranta  
**9-10 Settembre 2021**



In copertina: When pig fly - Nicoletta Belletti  
[www.nicolettabelletti.com](http://www.nicolettabelletti.com)

SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

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

**2021**



Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini  
XLVI Meeting Annuale, Peschiera (VR), 9-10 Settembre 2021.

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Agosto 2021.

ISBN 978-88-943304-1-0

## INDICE

|                  |       |
|------------------|-------|
| Prefazione ..... | p. 23 |
|------------------|-------|

### ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

#### **COSCE E CARCASSE: CRITICITÀ DI UN PRODOTTO D'ECCELLENZA**

*Parma, 11 Ottobre 2019*

|                                                                                                                                  |       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| IL TRASPORTO DEI SUINI AL MACELLO IN RELAZIONE ALLA QUALITÀ<br>DELLE COSCE<br><i>Corlianò M.C., Benatti D., Orlandi B.</i> ..... | p. 27 |
| IL MACELLO: VALORIZZAZIONE DEL PRODOTTO FINALE<br><i>Streparola D.</i> .....                                                     | p. 31 |

### ATTI DEL XLVI MEETING ANNUALE

*Pescantina (VR), 9-10 Settembre 2021*

|                                                                                                                                      |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| IMPLICAZIONI ALIMENTARI NELLA ESPRESSIONE DI ALCUNE PATO-<br>LOGIE ENTERICHE DEL SUINO<br><i>Bardini R.</i> .....                    | p. 43 |
| VENTILAZIONE E BENESSERE SUINO<br><i>Escobet Riu J.</i> .....                                                                        | p. 49 |
| L'ALLEVAMENTO TECNOLOGICO, IL FUTURO È ADESSO<br><i>Galofré R.</i> .....                                                             | p. 51 |
| FREQUENTI ERRORI DI MANAGEMENT<br><i>Guadagnini G.</i> .....                                                                         | p. 53 |
| ECOSISTEMI ZOOTEKNICI DI PRECISIONE: INTEGRAZIONE DI TECNO-<br>LOGIA, PROCESSO E CULTURA<br><i>Polson D.</i> .....                   | p. 57 |
| STRATEGIE DI ZOOTECNIA DI PRECISIONE PER L'ALLEVAMENTO SUINO.<br>IL FUTURO DELL'ALLEVAMENTO È OGGI REALTÀ.<br><i>Alonso C.</i> ..... | p. 63 |
| GARANZIE SANITARIE DEL TRASPORTO. QUANTO POSSIAMO RITE-<br>NERCI SICURI?<br><i>Romagosa A.</i> .....                                 | p. 67 |

## COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

TRASPORTO AL MACELLO AUMENTA LA CARICA DI *SALMONELLA* NELLE  
FECI E MODIFICA IL MICROBIOTA DEI SUINI DA INGRASSO

*Massacci F.R., Morelli A., Cucco L., Zicavo A., Tofani S., Pezzotti G., Estellé J.,  
Panicià M., Magistrali C.F.* ..... p. 75

LA CARATTERIZZAZIONE DI *STREPTOCOCCUS SUI* ISOLATI DA FOCOLAI DI  
MALATTIA NEGLI ALLEVAMENTI ITALIANI RIVELA LA DIFFUSIONE DI NUOVI  
CLONI CON POTENZIALITÀ ZOONOSICA E RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI

*Cucco L., Panicià M., Massacci F.R., Morelli A., Ancora M., Mangone I., Di Pasquale A.,  
Luppi A., Vio D., Rolla U., Camma' C., Magistrali C.F.* ..... p. 85

INFEZIONI DA PCV2, PCV3 E PORCINE CIRCOVIRUS-LIKE VIRUS P1 NEI  
SUINI DI ALLEVAMENTO E NEI CINGHIALI SELVATICI

*Faccini S., Ferrarini G., Barbieri I., Boniotti M.B., Alborali L.G., Luppi A., Chiapponi C.,  
Bonilauri P., Gradassi M., Ventura G., Moreno A., Gibelli L.R., Pezzoni G., Rosignoli C.* ..... p. 95

PARAMETRI ISTOLOGICI DI STIMA DELL'EFFICACIA DI VACCINI PCV2 A  
DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE

*Sarli G., D'annunzio G., Guarneri F., Bacci B., Boniotti M.B., Barbieri I., Lelli D.,  
Tresoldi E.T., Amadori M.* ..... p. 103

I NUOVI CEPPI ISOLATI DI VIRUS PRRS IN ALLEVAMENTO: COME RICO-  
NOSCERE LA LORO POSSIBILE VIRULENZA?

*Tonni M., Ferlazzo G., Ruggeri J., Guarneri F., Alborali G.L., Boniotti M.B.,  
Amadori M.* ..... p. 115

*ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA MATRICI PATOLOGICHE DI SUINO IN EMI-  
LIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021: VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE  
AGLI ANTIBIOTICI E DEI FATTORI DI VIRULENZA

*Bosco C., Bonilauri P., Rugna G., Luppi A., Fontana M.C., Fiorentini L., Bassi P.* p. 121

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E PROFILI DI ANTIMICROBICO-RE-  
SISTENZA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS SUI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI  
DEL NORD ITALIA NEL PERIODO 2013 - 2020

*Tonni M., Formenti N., Guarneri F., Romeo C., Guadagno F., Scali F., Rota Nodari S.,  
Bano L., Bacchin C., Maisano A.M., Vezzoli F., Rosignoli C., Santucci G., Luppi A.,  
Zoppi S., Pasquali P., Alborali G.L.* ..... p. 133

DOSI NUTRIZIONALI DI ZINCO MODULANO L'ESPRESSIONE GENICA DEI  
FATTORI DI VIRULENZA DI *ESCHERICHIA COLI* K88

*Bonetti A., Tugnoli B., Piva A., Grilli E.* ..... p. 145

VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI TRATTAMENTI ORALI NEI  
CONFRONTI DELLE PRINCIPALI INFEZIONI INTESTINALI DEI SUINI  
ALL'INGRASSO

*Galli M.C., Scollo A.* ..... p. 153

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |        |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ANALISI DELL'IMPATTO DELLA GENETICA DELLE SCROFE SU NUMERO E PESO DEI SUINETTI ALLA NASCITA IN UN ALLEVAMENTO ITALIANO<br><i>Guadagnini G., Ponzoni D., Ottolini F., Salvini F., Guadagnini M.</i> .....                                                                                                                                                    | p. 163 |
| EFFETTO DELLA SUPPLEMENTAZIONE DI L-ARGININA SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE E SUL PROFILO MICROBICO FECALE DELLA SCROFA IN GESTAZIONE<br><i>Correa F., Bertocchi M., Bosi P., Luise D., Spinelli E., Trevisi P.</i> .....                                                                                                                                   | p. 169 |
| CESTINO SPAZZATURA O RISORSA: ANALISI IN “VERTICALE” DELLE SCHEDE SCROFA A FINE CARRIERA<br><i>Paladin G.B., Nodari M.</i> .....                                                                                                                                                                                                                            | p. 179 |
| INDAGINE IN SUINI DOMESTICI E SELVATICI DELLA PROVINCIA DI BRESCIA PER EVIDENZIARE ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO ED AMPC<br><i>Guarneri F., Formenti N., Calò S., Parisio G., Birbes L., Pitozzi A., Scali F., Tonni M., Guadagno F., Giovannini S., Salogni C., Ianieri A., Bellini S., Pasquali P., Alborali G.L.</i> ..... | p. 185 |
| MALATTIA NEUROLOGICA IN SCROFE GESTANTI ASSOCIATA A PORCINE ASTROVIRUS TYPE 3: CASE REPORT<br><i>Rosignoli C., Gibelli L., Santucci G., Pigoli C., Marocchi L., Caleffi A., Faccini S.</i> .....                                                                                                                                                            | p. 197 |
| ESCHERICHIA COLI ENTEROTOSSIGENI ISOLATI DA FOCOLAI DI COLIBACILLOSI ENTERICA POST-SVEZZAMENTO<br><i>Torreggiani C., Torri D., Maioli G., Prosperi A., Chiapponi C., Bonilauri P., Gherpelli Y., Manfredi R., Dottori M., Luppi A.</i> .....                                                                                                                | p. 201 |
| RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO DI VALUTAZIONE DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI COME MATRICE PER LA RICERCA DI MICOPLASMI<br><i>Ustulin M., Rossi E., Targhetta C., Caporal A., Vio D.</i> .....                                                                                                                                                               | p. 207 |
| INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) NEGLI EMOSIERI TESTICOLARI<br><i>Di Bartolo I., De Sabato L., Chelli E., Alborali G.L., Tonni M., Monini M., De Lucia A., Ostanello F.</i> .....                                                                                                                           | p. 211 |
| CONFRONTO TRA L'UTILIZZO DI EMOSIERI TESTICOLARI E DI SANGUE NEL MONITORAGGIO DELLA PRRSV IN ALLEVAMENTI DA RIPRODUZIONE<br><i>Tonni M., Boniotti M.B., Ostanello F., Leotti G., Bianchi M., Andreoni S., Alborali G.L.</i> ...                                                                                                                             | p. 215 |
| SALIVA/FLUIDI ORALI <i>VERSUS</i> CAMPIONI DI SIERO: FATTIBILITÀ ED EFFICACIA DEL RILEVAMENTO DI ANTICORPI ANTI-SALMONELLA IN SUINI ALL'INGRASSO<br><i>De Lucia A., Cawthraw S., Davies R., Smith R.P., Bianco C., Ostanello F., Martelli F.</i> ....                                                                                                       | p. 233 |
| RIDURRE IL CONSUMO DI ANTIBIOTICO: RISULTATI DI UN PROGETTO PSR IN 30 AZIENDE DELL' EMILIA ROMAGNA NEL TRIENNIO 2016-2018<br><i>Bassi P., Trevisi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Rugna G., Motta V., Diegoli G., Merialdi G.</i> .....                                                                                                  | p. 243 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                        |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| EFFETTI DELLA GESTIONE AZIENDALE E DEL TAGLIO DELLA CODA<br>SULL'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI IN AZIENDE SUINICOLE ITALIANE<br><i>Tarakdjian J., Capello K., Pasqualin D., Santini A., Cunial G., Scollo A., Mannelli A.,<br/>Tomao P., Vonesch N., Di Martino G.</i> ..... | p. 251 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                    |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| VALUTAZIONE DELLE LESIONI NEI SUINETTI IN LATTAGIONE: EFFETTO<br>DEL TAGLIO DELLA CODA, DELL'ETÀ E DELLE CONDIZIONI DI ALLEVA-<br>MENTO<br><i>Vitali M., Santacroce E., Correa F., Salvarani C., Padalino B., Trevisi P.</i> ..... | p. 257 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                               |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEL CARAZOLOLO NELLA RIDUZIONE<br>DI FENOMENI DI MORSICATURA NEL SUINO A CODA LUNGA<br><i>Galli M.C., Scollo A., Contiero B., Delli Roccioli G., Mazzoni C., Gottardo F.</i> ..... | p. 269 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                             |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| OSSERVAZIONI PRELIMINARI SULLA PREVALENZA E DISTRIBUZIONE<br>DELLE LESIONI AL PIEDE DELLE SCROFE AL MACELLO<br><i>Ginestreti J., Cutroneo E., Maisano A.M., Biondo A., Vezzoli F.</i> ..... | p. 277 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| INNOVATIVI SISTEMI DI VALUTAZIONE DELLO STRESS NELLA SCROFA<br>ALL'INTERNO DI DIVERSE TIPOLOGIE DI GABBIE PARTO E LORO IMPAT-<br>TO SULLA MORTALITA' PRE-SVEZZAMENTO<br><i>Romano G., Bresciani C., Prandi A., Comin A., Righi F., Scollo A., Mazzoni C.</i> ..... | p. 289 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CONFRONTO TRA GLI INDICATORI ICEBERG DI BENESSERE ANIMALE<br>RILEVATI AL MACELLO E LE CONDIZIONI AMBIENTALI NEGLI ALLEVA-<br>MENTI DI SUINI A CODA INTEGRA: STUDIO PRELIMINARE<br><i>Guadagno F., Giudici F., Maisano A.M., Santucci G., Scali F., Formenti N.,<br/>Tonni M., Romeo C., De Luca, S., Ghidini S., Ianieri A., Castelluccio D.,<br/>Santucci U., Alborali G.L.<sup>1</sup></i> ..... | p. 303 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

## POSTERS

|                                                                                                                                                                                                                           |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| IMPATTO DELLA VACCINAZIONE PER VIA ORALE CON ENTERISOL® ILEI-<br>TIS IN ALLEVAMENTI D'INGRASSO SUI PARAMETRI DI CRESCITA E SUL<br>CONSUMO DI ANTIBIOTICI<br><i>Antonelli A., Bianchi M., Leotti G., Andreoni S.</i> ..... | p. 315 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |        |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS INFLUENZALI DI TIPO A ISOLATI DA<br>EPISODI DI INFLUENZA IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD-ITALIA NE-<br>GLI ANNI 2017-2019<br><i>Chiapponi C., Prosperi A., Faccini S., Moreno A., Alborali L., Baioni L., Gabbi V.,<br/>Manfredi R., Torreggiani C., Luppi A.</i> ..... | p. 321 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| PATTERN DI RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI <i>E. COLI</i> EN-<br>TEROTOSSIGENI (ETEC) E CEPPI DI <i>E. COLI</i> COMMENSALI ISOLATI IN SU-<br>INETTI CON DIARREA NEONATALE<br><i>De Lorenzi G., Alborali G.L., Baldo V., Tonni M., Giovannini S., Scaburri A.,<br/>Cerioli M.P., Bellini S.</i> ..... | p. 329 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |        |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ACIDI ORGANICI E COMPOSTI NATURALI IDENTICI PER IL CONTROLLO DI <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> NEL SUINO<br>Giovagnoni G., Tugnoli B., Piva A., Grilli E.....                                                                                                                                                                                                 | p. 335 |
| CONSUMO DI ANTIMICROBICI E PERFORMANCE PRODUTTIVE IN SCROFE E SUINETTI IN SALA PARTO<br><i>Giudici F., Scali F., Santucci G., Maisano A.M., Guadagno F., Tonni M., Foresti F., Giacomini E., Guadagnini G., Scollo A., Alborali G.L.</i> .....                                                                                                                                         | p. 341 |
| ANALISI DELLA DURATA DELLA GESTAZIONE IN UN ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO E PARAMETRI CORRELATI<br><i>Guadagnini G., Ponzoni D., Ottolini F., Salvini F., Guadagnini M.</i> .....                                                                                                                                                                                                         | p. 353 |
| SCREENING PER INFLUENZA IN DIECI ALLEVAMENTI SUINI DELLA LOMBARDIA<br><i>Guadagnini G., Ponzoni D., Ottolini F., Cossettini C., Zanni I., Chiapponi C., Prosperi A., Luppi A.</i> .....                                                                                                                                                                                                | p. 357 |
| MONITORAGGIO DEL BENESSERE ANIMALE AL MACELLO: LESIONI ALLA CODA E ALLA CUTE IN SUINI PESANTI ALLEVATI A CODA INTEGRA<br><i>Guadagno F., Maisano A.M., Scali F., Santucci G., Giudici F., Tonni M., Ianieri A., Ghidini S., Guarnieri C., Di Martino G., Scollo A., Castelluccio D., Santucci U., Vitali A., Rusconi C., Campana L., Vezzoli F., Bertocchi L., Alborali G.L.</i> ..... | p. 367 |
| MICROBIOMA ORALE DELLE SCROFE<br><i>Hattab J., Marruchella G., Pallavicini A., Gionechetti F., Mosca F., Trachtman A.R., Lanci L., Gabrielli L., Tiscar G.</i> .....                                                                                                                                                                                                                   | p. 375 |
| LO SVEZZAMENTO TARDIVO È ASSOCIATO AD UNA MAGGIORE DIVERSITÀ MICROBICA ED UNA ABBONDANZA DI <i>FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII</i> NEL MICROBIOTA FECALE DEI SUINETTI<br><i>Massacci F.R., Berri M., Lemonnier G., Guettier E., Blanc F., Jarret D., Rossignol M.N., Mercat M.J., Doré J., Lepage P., Rogel-Gaillard C., Estellé J.</i> .....                                             | p. 381 |
| METODI ALTERNATIVI PER IL RILIEVO DELLA TEMPERATURA CORPOREA DEI SUINI<br><i>Odintsov Vaintrub M., Hattab J., Di Giuseppe P., Trachtman A.R., Gabrielli L., Marruchella G.</i> .....                                                                                                                                                                                                   | p. 391 |
| ANEMIA FERROPRIVA DEL SUINETTO: PROBLEMA RISOLTO O NASCOSTO? INDAGINE SUL TASSO EMOGLOBINICO DEI SUINI ALLO SVEZZAMENTO E SULL'EFFICACIA DELLE DIVERSE TIPOLOGIE DI FERRO INIETTABILE<br><i>Pileri E., Cominotti F., Casappa P.</i> .....                                                                                                                                              | p. 397 |
| INDAGINE SULLE LESIONI SUGGERITIVE DI POLMONITE ENZOOTICA E PLEUROPOLMONITE NEI SUINI PESANTI AL MACELLO, ATTRAVERSO LA METODOLOGIA DEL "CEVA LUNG PROGRAM": IMPATTO DELLO SCHEMA VACCINALE VERSO MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE<br><i>Pileri E., Cominotti F., Casappa P., Rosina S.</i> .....                                                            | p. 405 |

LA MORTALITA' DEI SUINETTI PRE-SVEZZAMENTO VIENE INFLUENZATA TANTO DALLA TIPOLOGIA DI GABBIA PARTO QUANTO DAL PERIODO STAGIONALE

*Romano G., Bresciani C., Righi F., Tagliaferri L., Scollo A., Mazzoni C.*..... p. 413

PERICARDITE DA MYCOPLASMA HYORHINIS IN UN SUINETTO IN SVEZZAMENTO

*Rossi E., Ustulin M., Targhetta C., Tagliente D., Vio D.*..... p. 429

ACCASAMENTO DI SUINI NON CAUDECTOMIZZATI IN ALLEVAMENTI DEL VENETO: RISULTATI PRELIMINARI DELLA FASE VOLONTARIA DI APPLICAZIONE DEL PIANO D'AZIONE NAZIONALE

*Santini A., Tarakdjian J., Pasqualin D., Cunial G., Maisano A.M., Alborali G.L., D'Alba A., Di Martino G.*..... p. 433

EFFETTO DEL BETA-(1,3)-GLUCANI DERIVATO DALLE ALGHE SULLA RISPOSTA UMORALE ALLA VACCINAZIONE PRRSV NEI SUINI SVEZZATI

*Smeets N., Van Hamme V., Gonzalez Sanchez D., Mattuzzi S., M. Mateu E.*..... p. 441

SVEZZAMENTO SOSTENIBILE DEI SUINETTI CON LIVELLI CORRETTI DI ZINCO

*Kirwan S., Tóth S., Van Hamme V., Mattuzzi S., Di Benedetto M.*..... p. 445

RILIEVI ECOGRAFICI E PATOLOGICI IN SUINI AFFETTI DA POLMONITE PNEUMONIA IN PIGS: ULTRASOUND VS PATHOLOGICAL FINDINGS

*Tosi U., De Angelis U., Gabrielli L., Marruchella G.*..... p. 451

DESCRIZIONE DI UN CASO DI MORTALITA' AL RISTALLO IN UN SITO DI INGRASSO

*Trogu E.*..... p. 457

INCREMENTO DEL PESO ALLO SVEZZAMENTO IN SUINETTI ALIMENTATI CON LATTE ARTIFICIALE A SUPPORTO DEL LATTE MATERNO DURANTE LA LATTAZIONE

*Veloci M., Romano G., Ricci A., Scollo A., Mazzoni C.*..... p. 461

MONITORAGGIO DI PLEURITI, POLMONITI E LESIONI ALLA CODA IN SEDE DI MACELLAZIONE E INTERAZIONI CON PARAMETRI PRE-MACELLAZIONE E DI QUALITÀ DELLA CARCASSA

*Vitali M., Luppi A., Spinelli E., Bonilauri P., Santacroce E., Trevisi P.*..... p. 471

## **PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2020**

### **VINCITORE**

VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN  
UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA

*Bini G., Di Bartolo I., Ostanello F.*..... p. 485

## **PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2021**

### **VINCITORE**

UTILIZZO DELL'INTELLIGENZA ARTIFICIALE PER LO SCORE DELLE  
PLEURITI DEL SUINO

*Trachtman A.R., Bergamini L., Palazzi A., Porrello A., Capobianco Dondona A.,  
Del Negro E., Paolini A., Vignola G., Calderara S., Marruchella G.*..... p. 495

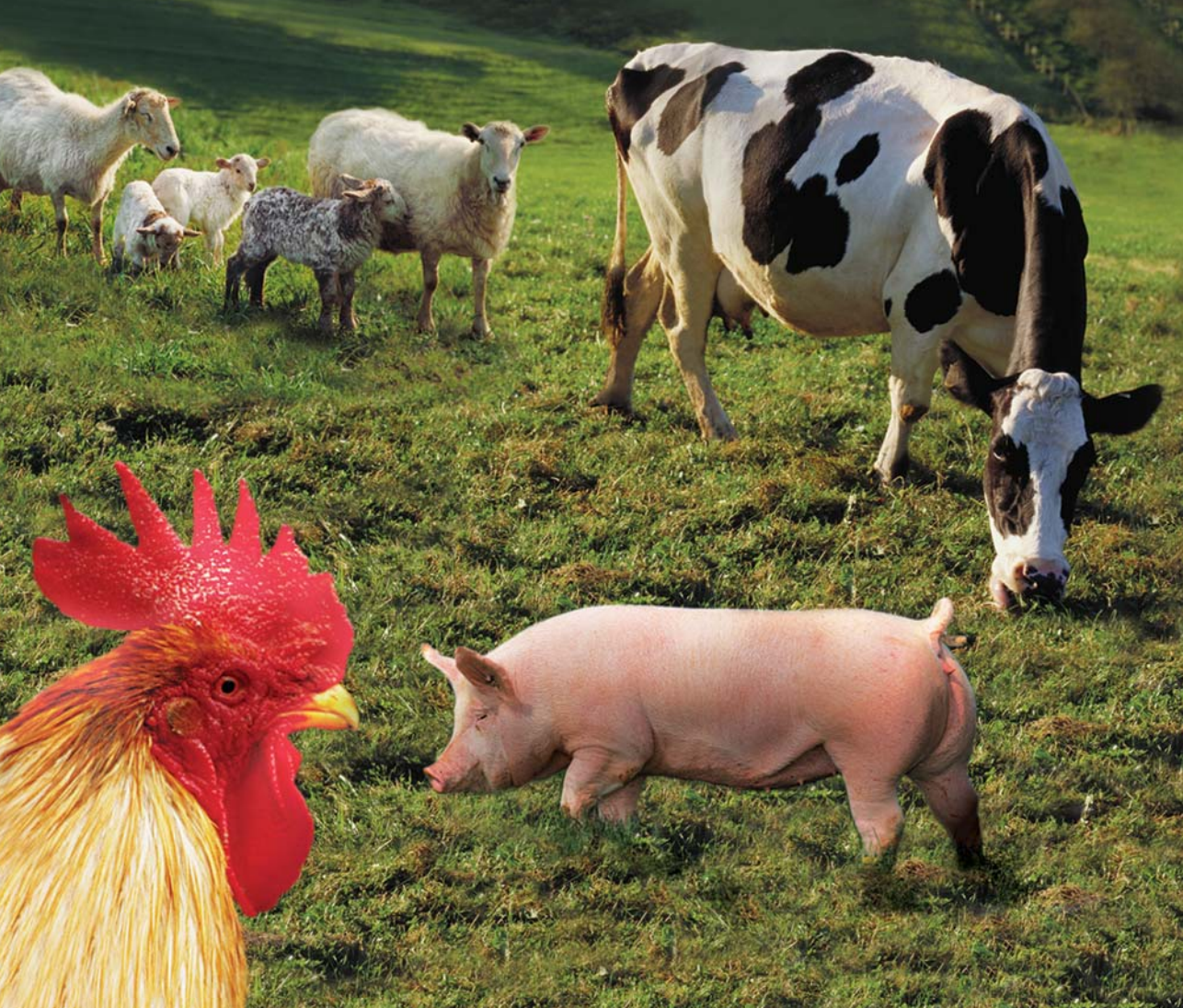
## **PREMIO CASIMIRO TAROCCO 2021**

### **VINCITORE**

NUOVO INDICE DI VALUTAZIONE DELLE PARTITE SUINE CONFERITE  
PRESSO IL MACELLO SULLA BASE DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE  
COSCE FRESCHE RIFILATE

*Viscido P.A.*..... p. 505





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



A man with a full, well-groomed brown beard and glasses is smiling slightly. He is holding a dark blue mug with both hands, and a small amount of steam is rising from it. He is wearing a dark grey t-shirt. On the left side of his chest, there is a white circular pin badge with the text "I RES-ULTS" and a small red piggy bank icon. The background is a dark, textured grey.

**+ peso**  
**- perdite**



**Boehringer  
Ingelheim**

SOSTENIAMO LE PERFORMANCE



# L'INTESTINO È DOVE TUTTO INIZIA...

Non permettere che la *Lawsonia*  
ne prenda il controllo



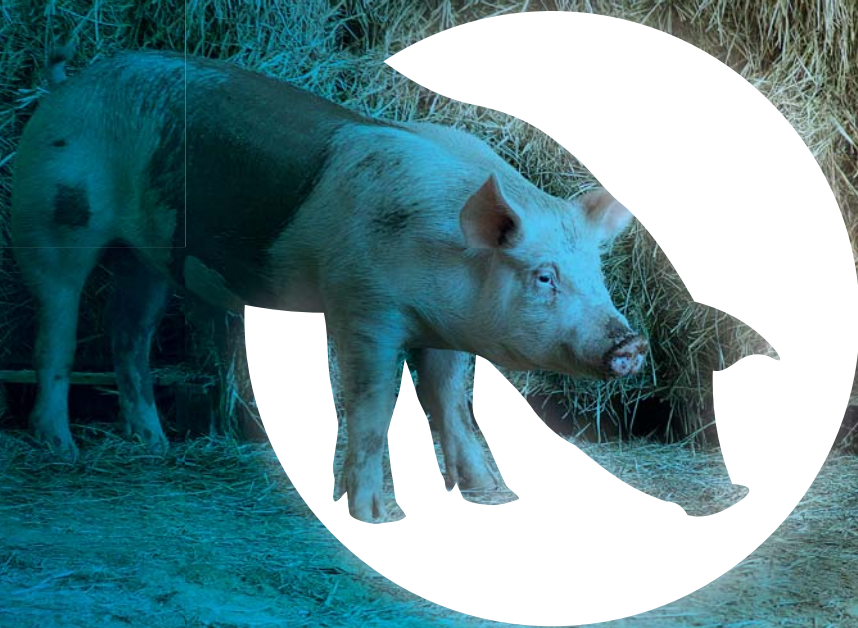
L'azione della *Lawsonia intracellularis* sulla mucosa intestinale determina un'alterazione del microbiota che può agevolare la proliferazione della **SALMONELLA**.

Un'azione mirata a livello intestinale è raccomandata per ripristinare il microbiota intestinale e per prenderti cura del tuo allevamento.

**CHIEDI AL TUO VETERINARIO**



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



## **Un range sempre più completo al tuo fianco:**

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



# UNA LUCE DIVERSA

sulla Prevenzione delle Patologie Suine

Un **range di vaccini** sempre  
più completo al tuo fianco  
per il trattamento di:

Polmonite Enzootica  
Pleuropolmonite  
Influenza Suina Classica  
e Pandemica  
Salmonella  
Malattia degli Edemi  
Circovirus  
Mal Rossino  
Parvovirosi  
Sindrome Riproduttiva  
e Respiratoria del Suino



Impegnati con voi ed il settore suinicolo  
grazie all'innovazione.

Together, beyond animal health



OVUNQUE CI PORTI IL FUTURO  
GARANTIAMO LA LORO SALUTE



la più VASTA GAMMA  
di TERAPIE  
FARMACEUTICHE



PRODOTTI NATURALI  
ALTERNATIVI  
all'USO di ANTIBIOTICI

SOLUZIONI di  
BIOSICUREZZA  
TESTATE ed EFFICACI



# The smart choice for healthy livestock

## CHI SIAMO

Dopharma è un'azienda farmaceutica veterinaria di proprietà della famiglia De Bruijn con sede in Olanda. Fin dall'anno della sua fondazione nel 1969, Dopharma offre prodotti veterinari di alta qualità con un focus esclusivo negli animali da reddito. I prodotti Dopharma sono commercializzati in oltre 80 paesi da 7 filiali locali e circa 70 partner di distribuzione. Dopharma produce antibiotici, antiparassitari, antinfiammatori, ormonali e mangimi complementari.



[info@dopharma.it](mailto:info@dopharma.it) • [www.dopharma.it](http://www.dopharma.it)



# *Dopharma* Italia



## The smart choice for healthy livestock

### IL NOSTRO IMPEGNO

Ci prefiggiamo di creare soluzioni innovative e prodotti efficaci e di alta qualità. Siamo parte di Animal Health Europe e crediamo che salute degli animali, dell'uomo e dell'ambiente siano intimamente connesse. Sosteniamo appieno i principi di One Health, promuovendo un uso responsabile degli antibiotici anche attraverso terapie di supporto, vaccini e l'uso razionale degli antimicrobici stessi per massimizzarne e preservarne l'efficacia.



**[info@dopharma.it](mailto:info@dopharma.it) • [www.dopharma.it](http://www.dopharma.it)**



MEDICAZIONE

SOSTENIBILITÀ

PROTEZIONE

ALIMENTAZIONE

BIOSICUREZZA

## 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.

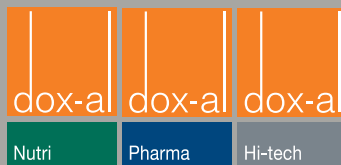
Una competenza unica, che ci permette di sviluppare

- ✓ 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](http://www.doxal.com)

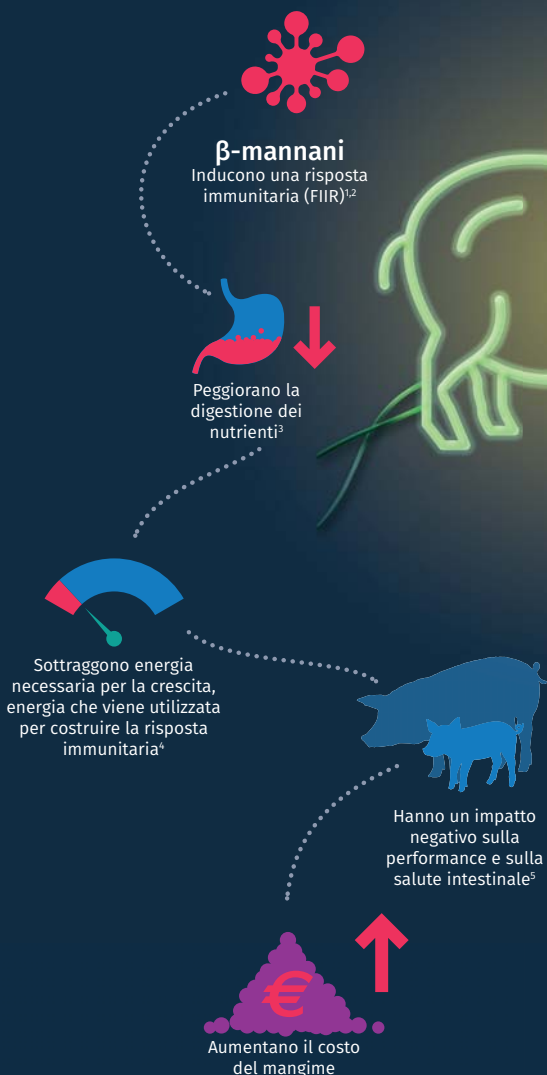


# I BENEFICI DI HEMICELL

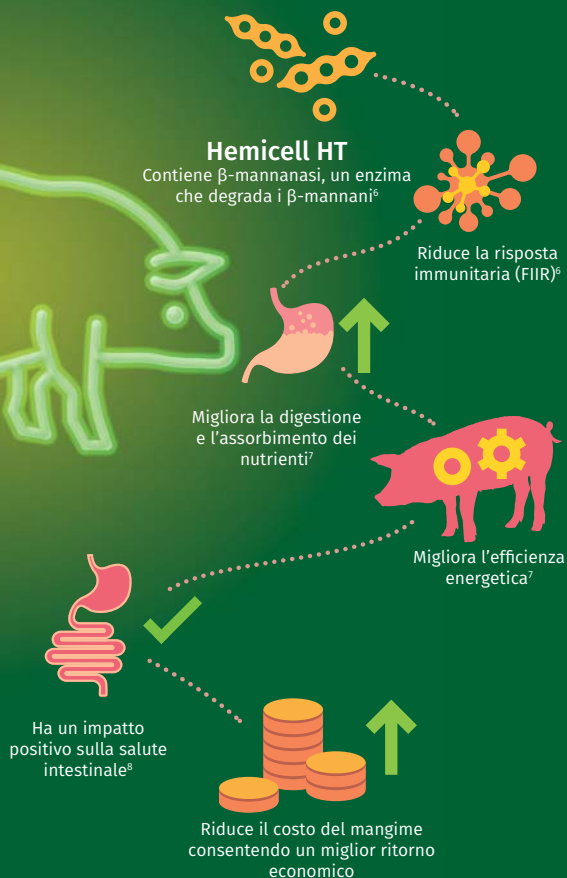
Sono facili da “digerire”

Il mangime fornisce l'energia necessaria a promuovere la crescita dei suini, tuttavia la loro dieta può contenere anche  $\beta$ -mannani, sostanze che scatenano una risposta immunitaria a livello di apparato digerente. Evento che influisce negativamente sulla salute e sulla performance degli animali.

## IL PROBLEMA



## LA SOLUZIONE



Studi clinici dimostrano che l'aggiunta di Hemicell HT al mangime migliora la salute e il benessere degli animali.  
**Hemicell HT. Più energia per la loro salute e per i tuoi profitti.**

1. Anderson DM, Hsiao HY, and Dale NM. 2008. Identification of an inflammatory compound for chicks in soybean meal-II. Poultry Science 2008; 87: 159. (REF-01075). 2. Worthley, D.L., Barty, P.G., Mulligan, C.G. 2005. Mannose-binding lectin: biology and clinical implications. Internal Medicine Journal 2005; 35 (9): pp 548-555. (REF-01146). 3. Gabler, N. and Spurlock, M. 2008. Integrating the immune system with the regulation of growth and efficiency. J. Anim. Sci. 86: E64-E74. (REF-00805). 4. Spurlock, M. 1997. Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. J. Anim. Sci. 75: 1773-1783. (REF-00807). 5. Zuo, J.J. et al. 2014. Supplementation of  $\beta$ -Mannanase in Diets with Energy Adjustment Affect Performance, Intestinal Morphology and Tight Junction Protein mRNA Expression in Broiler Chickens. J. Animal and Vet. Adv. 13(3): 144-151. 2014 (REF-09891). 6. Anderson, D.M. & Hsiao H.-Y. 2009. "New Feed Enzyme Development." ChemGen Corp. 2009. 1: 1-30. (REF-01125). 7. Caldas, J.V. et al. 2018. The effect of  $\beta$ -mannanase on nutrient utilization and blood parameters in chicks fed diets containing soybean meal and guar gum. 2018 Poultry Science 01-11. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey099>. (REF-07106). 8. Qiao, Y., Zhu, X., Zhai, L., Payne, R., and Li, T. 2017. Dietary soybean meal level and  $\beta$ -mannanase supplementation affected immunoproteins in carotid artery and morphology and aquaporin water channels in small intestine of nursery pigs. Journal of Animal Science Vol. 96, suppl. S3. PSIII-36. REF-00994.

**PRRS**control.com

---

# VACCINAZIONE SUINETTI: FEEL THE BENEFITS!

---



Il Riferimento  
nella **Prevenzione**  
in **Salute Animale**

**HIPRA ITALIA**

Via Enrico Mattei, 2 25030 Coccaglio (BS) Italy

Tel.: (+39) 030 7241821 · Fax: (+39) 030 7700881 · [italia@hipra.com](mailto:italia@hipra.com) · [www.hipra.com](http://www.hipra.com)

## PREFAZIONE

Cari Soci,

è tradizione che il volume degli atti della SIPAS venga introdotto da una prefazione redatta da uno dei membri del Consiglio Direttivo. Nel 2016 fu il mio turno, quando come segretario uscente accettai con piacere il compito assegnatomi dall'allora Presidente Dr Alborali. Quattro anni dopo, sono andato a rivedermi i contenuti di quella introduzione che verteva principalmente sulla crisi della suinicoltura italiana, sulle prospettive e aspettative professionali dei giovani colleghi, spesso disattese e sullo stato della SIPAS, che viveva in quel periodo una crisi d'identità e d'intenti.

Dopo anni di difficoltà, nel 2019 la suinicoltura del nostro paese ha manifestato segnali estremamente positivi e si è assistito ad una ripresa della redditività degli allevatori italiani. Tuttavia, le numerose sfide ed i repentini cambiamenti che il settore suinicolo si trova a dover affrontare, richiedono un forte impegno per farsi trovare preparati. Mi riferisco ai cambiamenti che allevatori e veterinari stanno affrontando nell'ambito della terapia antibiotica, nell'applicazione delle norme sul benessere animale e in particolare sul taglio della coda, sull'introduzione della ricetta elettronica e sul percorso del sistema Classyfarm, per citarne alcune. La necessità di rimanere al passo con i tempi, se vista come un'opportunità, può portare ad un sostanziale miglioramento della suinicoltura italiana. La SIPAS, come importante strumento per raggiungere questo obiettivo, può fornire un valido contributo, attraverso l'organizzazione di specifici momenti di formazione e favorendo lo sviluppo di sinergie tra le diverse figure professionali che ruotano attorno alla suinicoltura.

Ma veniamo ai giovani laureati. Da diversi anni la SIPAS supporta economicamente la formazione di giovani laureati che vogliano approfondire le loro conoscenze nei diversi ambiti della suinicoltura, attraverso la creazione di percorsi formativi e stage, sia all'estero che in Italia. Questo perché è estremamente importante nella nostra professione "non rimanere indietro", convinti come Consiglio Direttivo SIPAS, che le attività formative proposte dalla Società possano essere d'ausilio per la loro crescita e per la realizzazione delle loro aspettative professionali, nonché per la crescita del settore suinicolo.

Il volume degli atti, che come sempre accompagna lo svolgimento del congresso, comprende i testi relativi agli argomenti che verranno trattati nel corso delle due giornate del Meeting, ma anche quelli che hanno caratterizzato la giornata autunnale di Ottobre 2019 tenutasi a Parma e dedicata ad un argomento decisamente trasversale "Cosce e carcasse: criticità di un prodotto d'eccellenza". Questo è completato dalle comunicazioni scientifiche inviate dai soci, che riguardano argomenti di attuale interesse. La produzione scientifica inviata dai Soci, in numero progressivamente crescente negli ultimi 10 anni, assume grande importanza ed è il segno della vivacità e della partecipazione alla vita della Società da parte dei Soci stessi.

Un ringraziamento particolare va ai colleghi del Consiglio Direttivo con i quali ho condiviso questo primo anno e con cui si è cercato, attraverso un costante impegno, di lavorare in sintonia con le aspettative dei soci e per la Società.

Un ringraziamento sincero va alla Segreteria Delegata, per la professionalità e la disponibilità dimostrata e per la fattiva collaborazione.

Un doveroso ringraziamento va agli Sponsor che anche quest'anno hanno continuato a supportare la SIPAS.

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

Il Presidente  
Dr. Andrea Luppi





ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

**COSCE E CARCASSE:  
CRITICITÀ DI UN PRODOTTO D'ECCELLENZA**

*Parma, 11 Ottobre 2019*



# IL TRASPORTO DEI SUINI AL MACELLO IN RELAZIONE ALLA QUALITÀ DELLE COSCE

## THE CORRELATION BETWEEN PIGS TRANSPORT TO THE SLAUGHTERHOUSE AND THEIR LEGS QUALITY

CORLIANÒ M.C., BENATTI D., ORLANDI B.

*Opas società cooperativa agricola, Carpi (MO)*

**Parole chiave:** Trasporto degli animali al macello, qualità delle carcasse, qualità delle cosce  
**Key Words:** Animal transport to the slaughterhouse, carcass quality, legs quality

### RIASSUNTO

Il trasporto degli animali al macello rappresenta un momento critico all'interno della filiera produttiva. Il presente lavoro ha l'intento di raccogliere dati preliminari sulla correlazione tra condizioni di trasporto degli animali e qualità del prodotto finito prendendo in considerazione il taglio anatomico più importante in Italia, ovvero la coscia dell'animale. 134 partite provenienti dal Nord Italia sono state analizzate nel periodo che va da giugno a metà settembre 2019 raccogliendo i dati relativi al trasporto, gli indicatori di benessere, le caratteristiche delle partite e i difetti sulle cosce rilevati al macello.

### ABSTRACT

Animals transport to the slaughterhouse represents a critical step within the pork production chain. The aim of this work is to collect preliminary data on the correlation between animal transport conditions and quality of the finished product taking into consideration the most important anatomical cut in Italy, the thigh of the animal.

134 batches of animals from Northern Italy were analyzed in the period from June to mid-September 2019 collecting data relating to transport, welfare indicators, batches characteristics and thighs defects detected at the slaughterhouse.

### INTRODUZIONE

Il trasporto è considerato un fattore di stress complesso a cui gli animali sono esposti a causa di una serie di stimoli negativi; come vibrazioni, nuove condizioni ambientali, variazioni di temperatura e umidità, il mescolamento di animali di gruppi diversi, rumori. Tutti questi elementi possono causare problemi di benessere animale e perdite economiche visibili attraverso un aumento delle lesioni cutanee e una riduzione delle caratteristiche della qualità della carne suina (*Dalla Costa et al., 2017*). Anche fattori quali disponibilità di spazio, durata del trasporto, design dei veicoli e il tipo di guida influenzano il benessere dei suini.

Il carico degli animali sul mezzo di trasporto è considerato il momento più critico come dimostrano l'aumento della frequenza cardiaca (fino a 160 battiti al minuto), e indicatori di stress (quali cortisolo salivare e lattato sanguigno) messi in relazione ai livelli osservati nei suini a riposo. Lo stress al momento del carico è il risultato della combinazione di diversi fattori tra cui: la lunghezza e la tipologia di percorso degli animali dai box fino al punto di carico, la separazione del gruppo all'interno dei box, la numerosità del gruppo di animali movimentati, la luminosità e rumorosità dell'ambiente circostante e il design della rampa di carico. Anche il livello di formazione del personale addetto al carico è di fondamentale importanza in questa fase (*Goumon et al., 2017*).



## **MATERIALI E METODI**

Tra giugno e metà settembre 2019, 134 partite di animali provenienti dal nord Italia sono state analizzate raccogliendo i dati relativi al trasporto, gli indicatori del benessere, le caratteristiche delle partite e i difetti sulle cosce rilevati al macello.

Gli allevamenti da cui provenivano le partite sopramenzionate erano situati nelle Regioni dedicate alla produzione del suino pesante (160kg).

I dati di trasporto tenuti in considerazione erano: distanza in km dall'allevamento al macello, orario di partenza, temperatura minima, massima e percentuale di umidità della giornata di trasporto, mescolamento o meno degli animali prima, durante e dopo il trasporto. Gli indici di benessere riguardavano la percentuale di graffi cutanei distinti nella regione craniale della carcassa, a livello di tronco e posteriori, lesioni alla coda e lesioni alle orecchie.

Le caratteristiche delle partite comprendevano invece: la percentuale di carne magra media rilevata al macello e il peso medio vivo della partita. I dati raccolti nel reparto rifilatura prosciutti relativamente ai difetti sulle cosce erano: la percentuale di graffi, ematomi e strappi muscolari per ogni partita. Inoltre, per ogni partita è stato registrato il tipo di automezzo utilizzato (bilico vs altri), l'eventuale spostamento degli animali dal rimorchio alla motrice, e il nome dell'autista.

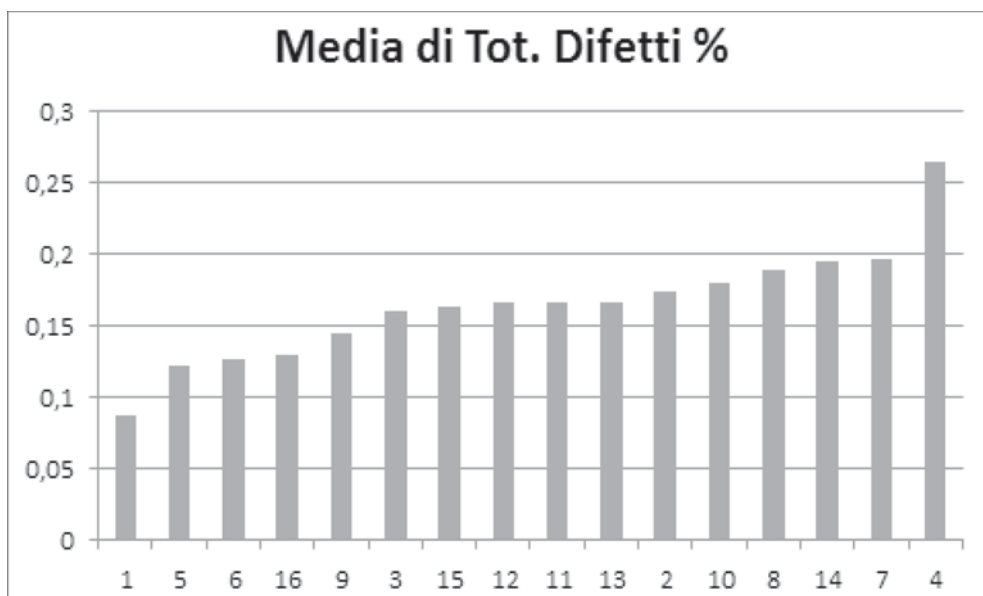
I dati sono stati analizzati con il test per due campioni di Wilcoxon, creando la variabile indipendente della durata del viaggio: viaggi brevi <50km; medi >50km e <140km; lunghi >140km.

## **RISULTATI**

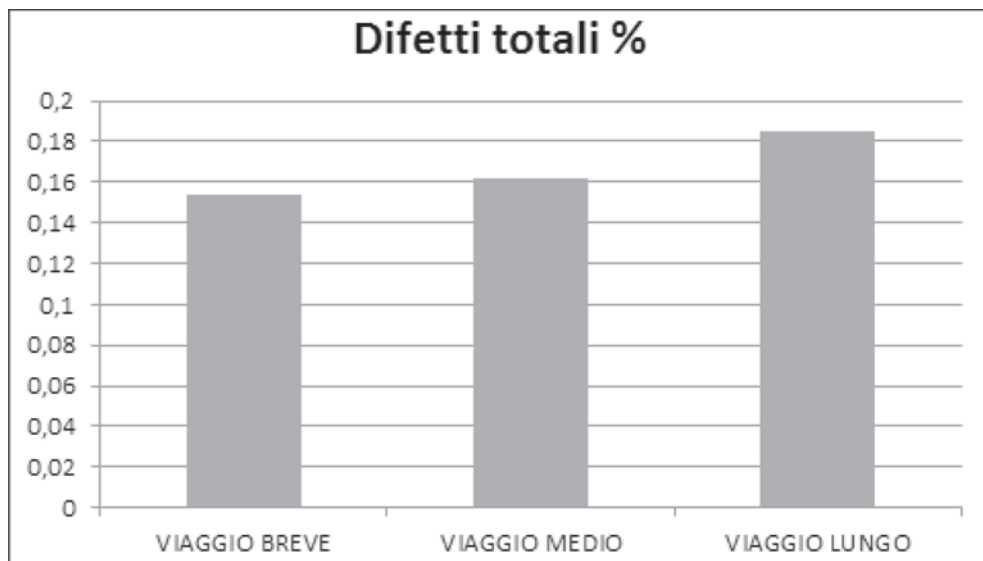
La percentuale dei difetti delle carcasse non è stata influenzata da nessuna variabile legati al tipo di mezzo utilizzato per il trasporto né dalle caratteristiche del viaggio (lunghezza e temperatura/umidità ambientale;  $P>0,05$ ). Tuttavia un forte effetto è stato riscontrato a seconda dell'autista. Il grafico 1 mostra 16 trasportatori diversi (numerati da 1 a 16), ognuno dei quali ha svolto da 3 a 10 viaggi, in relazione ai difetti delle cosce delle singole partite, considerando la percentuale di graffi, ematomi, strappi muscolari. La % media di difetti totali delle cosce risulta più elevata per l'autotrasportatore n.4, valutato su 4 scarichi provenienti da 4 aziende diverse. I difetti totali vanno da un minimo di 0.08% per il trasportatore n.1 ad un massimo di 0.26% per il trasportatore n. 4.

Una tendenza statistica ( $P=0.08$ ) è emersa per la percentuale totale di difetti delle cosce in relazione alla distanza percorsa durante il viaggio verso il macello. Nel secondo grafico si vede come per i viaggi > 140 km la percentuale sia superiore (0,19%) rispetto ai viaggi < 50km (0.15%) e medi, >50km<140km (0.16%), stabilendo quindi una blanda correlazione tra durata del trasporto e difetti totali.

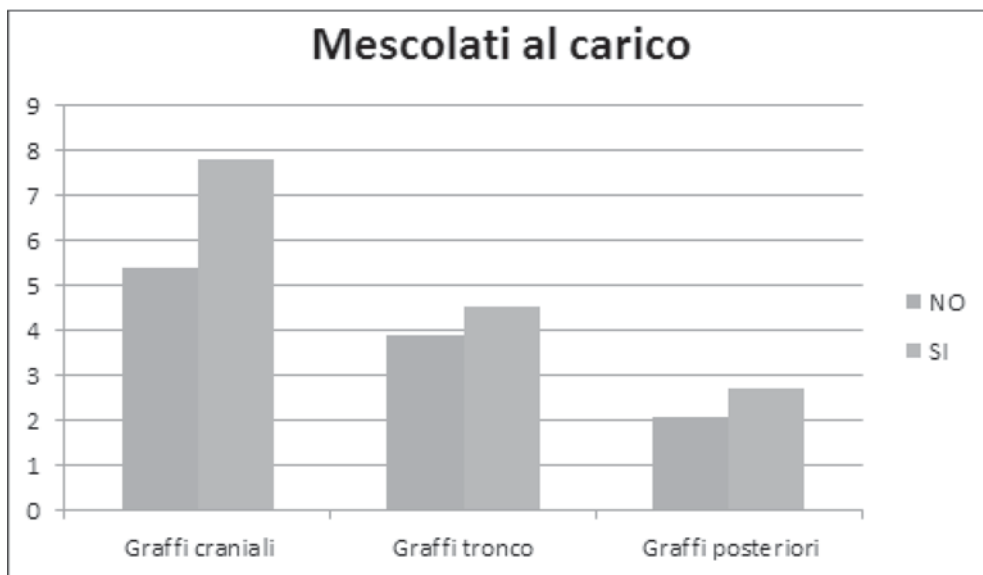
Alcune differenze sono invece emerse per gli indici di benessere, ovvero i graffi cutanei della carcassa. Nel terzo grafico gli animali mescolati al carico presentano una percentuale di graffi soprattutto nella parte craniale della carcassa superiore rispetto a quelli non mescolati. La percentuale di graffi craniali per i suini mescolati al carico rappresenta il 7.8% mentre per i suini non mescolati è il 5.6%. Nella parte del tronco questa differenza si riduce, infatti per i suini mescolati al carico rappresenta il 4.4%, per quelli non mescolati il 3.9%. Nella parte posteriore delle carcasse la percentuale di graffi per i suini mescolati al carico è del 2.6%, per quelli non mescolati 2.1%.



**Grafico 1: relazione tra trasporto e difetti delle cosce delle singole partite.** In questo grafico sono stati presi in considerazione 16 trasportatori diversi (numerati da 1 a 16), ognuno dei quali ha svolto da 3 a 10 viaggi, in relazione ai difetti delle cosce delle singole partite, considerando la percentuale di graffi, ematomi, strappi muscolari. La % media di difetti totali delle cosce risulta più elevata per l'autotrasportatore n.4, valutato su 4 scarichi provenienti da 4 aziende diverse.



**Grafico 2: relazione tra i difetti totali delle carcasse e la durata del trasporto.** Percentuale dei difetti totali durante i viaggi brevi: <50km, medi >50km e <140km, lunghi >140km. I difetti totali si riferiscono agli ematomi, strappi muscolari e graffi sulle carcasse.



**Grafico 3: relazione tra graffi cutanei nella parte craniale, del tronco e posteriore delle carcasse e le modalità di carico dei suini (mescolati in arancione o non mescolati in blu).**

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L’elaborazione dei dati riferibili alle 134 partite evidenzia come il tipo di trasporto, le modalità di carico, la distanza percorsa e il mescolamento degli animali incidano relativamente poco sulla qualità delle carcasse e del prodotto finito, mentre invece influiscano di più sugli indicatori di benessere degli animali. Ad incidere in maniera evidente sulla qualità della carcassa e della coscia è invece il tipo di guida, in quanto la variabile “autista” rappresenta quella di maggior peso sulla variazione dei difetti del prodotto.

I risultati ottenuti nel presente lavoro forniscono dei dati preliminari importanti circa la correlazione tra condizioni di trasporto e difetti sulle carcasse e sulle cosce delle partite di animali macellati. I dati raccolti mostrano l’importanza di un’accurata supervisione e controllo del trasporto che va dalla fase di carico degli animali in allevamento alla fase di scarico in macello e delle operazioni correlate.

Questi risultati permettono anche di suggerire un metodo per qualificare i trasportatori e poter intervenire per correggere i problemi riscontrati con più efficacia.

## BIBLIOGRAFIA

1. Dalla Costa F., Lopes L. S., Dalla Costa O. A., 2017. *Effects of the Truck Suspension System on Animal Welfare, Carcass and Meat Quality Traits in Pigs*. *Animals journal* 2017, 7, 5
2. Goumon S., Faucitano L., 2017 *Influence of loading handling and facilities on the subsequent response to pre-slaughter stress in pigs*. *Livestock Science* 200 (2017) 6-13

## IL MACELLO: VALORIZZAZIONE DEL PRODOTTO FINALE

### ***THE SLAUGHTERHOUSE: THE KEY POINT FOR THE IMPROVEMENT OF THE FINAL PRODUCT***

STREPAROLA D., DVM

*La Pellegrina spa - Gruppo Veronesi, Consigliere Sipas*

Come ben sappiamo, la produzione suinicola italiana è particolarmente legata alla produzione di prodotti DOP soprattutto derivati dalle cosce. In questa ottica, il macello è un punto determinante nella valorizzazione dei prodotti finali derivanti dalla macellazione di animali pesanti; spesso però si trova a dover gestire criticità conseguenti ad errori di gestione in allevamento o alla movimentazione degli animali, cercando di limitare al massimo il deprezzamento dei tagli freschi. In particolare, le cosce sono i tagli più nobili con maggior valore, ma sono anche quelle che più facilmente manifestano difettosità sia perché evidenziano problematiche che ne impediscono la successiva stagionatura o la lavorazione (per caratteristiche non idonee ai fini tecnologici come ad es. il pH), sia perché manifestano difetti secondo i disciplinari DOP che ne obbligano l'esclusione dal circuito (es. ematomi, grassinatura, venature eccessive, ecc.).

Un breve cenno anatomico ci permetterà di capire meglio i difetti riscontrabili nelle cosce rimandando ai testi di anatomia veterinaria (R. Barone) per uno studio più particolareggiato. Le masse muscolari che più ci interessano sono:

- Quadricipite femorale (Noce) nella parte craniale;
- Semimembranoso (parte della Fesa) nella parte mediale;
- Semitendinoso (Girello) nella parte caudale;
- Bicipite femorale (Sottofesa) nella parte laterale.

A livello microscopico questi muscoli sono formati da una proporzione variabile di fibre rosse e fibre bianche con caratteristiche e particolarità tali da poter compromettere la qualità post-macellazione delle cosce.

In particolare le fibre rosse (prevalenti nel quadricipite femorale) sono tali perché ricche di mioglobina e con un'elevata densità di mitocondri, sono molto vascolarizzate e hanno un'elevata resistenza alla fatica con un metabolismo prevalentemente aerobico; le fibre bianche, al contrario, sono più presenti nei distretti muscolari esterni (bicipite femorale e semitendinoso) sono invece meno ricche di mioglobina, hanno bassa densità di mitocondri, sono poco vascolarizzate, hanno un metabolismo prevalentemente anaerobico, hanno una bassa resistenza alla fatica ma entrano in funzione con contrazioni molto veloci e con potenza elevata (es. reazione di fuga e/o combattimento).

Queste particolarità sono alla base, per esempio, del difetto di bitonalità o carni simil-pse, caratterizzate da colorazione normale o leggermente più scura nei distretti muscolari più profondi (quadricipite femorale) e una colorazione più chiara e traslucida (per essudazione di succhi cellulari) nei distretti più superficiali (bicipite femorale, semitendinoso). Quest'ultima anomalia, a sua volta, è conseguente ad un abbassamento del pH (< 5,5) per l'elevata circolazione di catecolamine che provocando rapida glicogenolisi e conseguente produzione e accumulo di acido lattico determina danni alle membrane cellulari che rendono problematica la salagione successiva.

I distretti anatomici descritti sono anche importanti nella classificazione merceologica di altri prodotti derivanti dalle cosce come il prosciutto cotto: la distinzione anatomica di almeno tre dei quattro muscoli descritti, permette di poter distinguere un prosciutto cotto di "alta qualità" rispetto ad un prodotto di minor pregio.

Le cosce sono i tagli freschi di maggiore importanza per la redditività del macello: rappresentano circa il 25 % del valore del suino macellato e sezionato. Per essere tali però devono essere cosce di prima qualità cioè cosce senza difetti secondo i disciplinari del Consorzio di Parma e San Daniele. In questo contesto il macello può operare in due modi : lavorare nel pieno rispetto dei disciplinari inviando alla stagionatura tutte le cosce di 1a marchiabili, lasciando ai prosciuttifici la successiva valutazione e respingere i prodotti che non superano i propri livelli di qualità commerciale (es. più spessore di grasso, assenza completa del reticolo venoso ecc.), oppure operare con un standard di selezione più ristretto tale da soddisfare le esigenze commerciali di ogni prosciuttificio evitando così di processare eventuali cosce di ritorno. Abbiamo quindi due categorie di cosce: quelle di 1a marchiabili nel pieno rispetto dei disciplinari e che mediamente rappresentano il 78-80% di ogni partita oppure quelle di 1a commerciale che soddisfano a pieno i canoni di qualità tipici dei prosciuttifici più esigenti che mediamente rappresentano il 68-70 % di ogni lotto.

Indipendentemente da questa precisazione importante per analizzare dati di macellazione di impianti diversi, dobbiamo ricordare che qualora una coscia presenti un difetto tale da non poter essere classificata di 1a qualità ed essere esclusa dalla filiera DOP, si deprezza di circa il 30% del suo valore commerciale (prosciutti crudi nazionali no DOP e/o cotti), mentre se il difetto è tale da determinarne il completo disosso (es. estesi ematomi da carico e scarico), il valore commerciale si riduce circa del 60% rispetto ad una coscia senza difetti.

In termini più tangibili se consideriamo il prezzo medio delle cosce fresche Parma del 2018 con un peso medio di una coscia rifilata di 14 Kg, la perdita per ogni suino è di circa 38 euro :

|                                         |              |
|-----------------------------------------|--------------|
| • Prezzo medio 2018 cosce fresche Parma | 4,70 euro/Kg |
| • Peso medio cosce                      | 14,00 Kg     |
| • Cosce 1a qualità ( 4,70 x 14,00)      | 65,80 euro   |
| • Cosce difetto -29% ( 65,80 x 0,29 )   | 19,08 euro   |
| • Perdita per ogni suino ( 19,08 x 2)   | 38,16 euro   |

Se poi consideriamo che il costo medio di macellazione e sezionamento (trasporto incluso) di ogni capo in un macello italiano si aggira attorno ai 36,91 euro/capo (fonte ISMEA – CRPA 2016) capiamo quanto è importante per il macello aver la piena disponibilità nella filiera DOP di tutte le cosce, soprattutto in determinati periodi dell'anno quando il valore del suino vivo non viene equilibrato da un aumento di valore dei tagli freschi.



**Figura 1**



**Figura 2**

Nella Figura 1 e 2 si vedono le caratteristiche macroscopiche delle cosce di 1a qualità: spessore grasso ben oltre i minimi 2 cm, colorazione uniforme della massa magra, assenza



di micro-emorragie, assenza di infiltrazione grassa nella muscolatura, assenza di ematomi e venatura sulla superficie esterna.

In merito alle difettosità invece, i più importanti e comuni difetti ascrivibili all'allevamento e al trasporto sono:

- Irritazione cutanea grave;
- Punture da insetto (zanzare);
- Carne pallida, soffice, essudativa (simil – pse);
- Spessore del grasso insufficiente (lato laterale);
- Spessore del grasso insufficiente – “magro in corona” (lato mediale);
- Muscolo infarcito di grasso (“grassinatura”);
- Ematoma da carico – trasporto – scarico (c/t/s);
- Versamento – strappo muscolare da c/t/s;
- Morsi durante il carico – trasporto – scarico c/t/s;
- Rottura vasi capillari nella muscolatura;
- Sangue nei vasi superficiali (“venature”).

Se volessimo raggruppare tali difettosità possiamo parlare di:

- Difettosità da movimentazione (ematomi, versamenti, morsi );
- Difettosità stress-dipendenti (carne simil-pse, rotture capillari, venature);
- Difettosità gestionali/genetiche (grassinatura, spessore grasso insufficiente, punture di zanzare, irritazione cutanea).

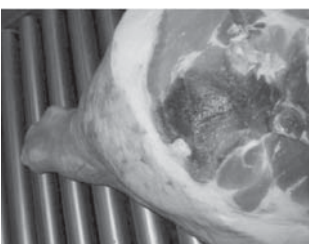
### **DIFETTOSITA' DA MOVIMENTAZIONE**

Rappresentano le perdite più elevate, in percentuale mediamente oscillano da un minimo del 3,5% ad un massimo di circa il 10 % . Sono rappresentate principalmente da ematomi esterni, versamenti interni, morsi o graffi da combattimento per mescolamenti di animali . Questi sono anche i difetti che più facilmente si possono attenuare con un'adeguata formazione del personale addetto alle operazioni di movimentazione.

Una particolare attenzione va fatta a seconda del prodotto finale delle cosce: ad esempio la presenza dello “zampetto” nel prosciutto di San Daniele rende la gamba più soggetta a difettosità per ematomi in caso di urti nella porzione più distale dove la pelle è direttamente a contatto con la componente ossea (urti contro truogoli, scale di carico, pianali del camion, ecc.).



**Figura 3:** Ematoma zampetto  
**Figure 3:** Paw hematoma



**Figura 4:** Versamento  
**Figure 4:** Blood spill



**Figura 5:** Morsi e graffi  
**Figure 5:** Bites and scratches

I versamenti o le emorragie muscolari invece sono tipici di pavimentazioni scivolose soprattutto piene, sporche e umide d'inverno che determinano strappi muscolari in seguito a movimenti repentini degli animali durante le operazioni di carico e scarico.

### **DIFETTOSITA' STRESS - DIPENDENTI**

In questa categoria si raggruppano rotture capillari, venature e colorazioni anomale delle masse muscolari (carni simil-pse). Mediamente determinano perdite che vanno da un minimo del 0,8% ad un massimo del 6,4 % e naturalmente dipendono molto dalla suscettibilità dell'animale allo stress (genetica ?) e/o ad eccessivi stimoli stressanti durante le operazioni di movimentazione (pile, pendenza eccessiva rampe di carico, urla , luce diretta, ecc.).

Tutti gli eventi stressanti determinano negli animali la cosiddetta reazione di “ fuga o combattimento” (Fight or Flight response) caratterizzata dall'attivazione dell' asse Ipotalamo – Ipofisi – Surrene con enorme immissione nel circolo sanguigno di adrenalina, noradrenalina e cortisolo. Questi mediatori chimici a loro volta determinano aumento della frequenza cardiaca (fino a 220-240 battiti al minuto), aumento della pressione circolatoria , vasocostrizione periferica, vasodilatazione muscolare, aumento della glicemia e produzione di acido lattico nelle fibre muscolari a metabolismo anaerobico che vengono coinvolte nella reazione di fuga con una contrazione rapida e potente (fibre bianche). In questa situazione di paura, come nell'uomo, l'animale ha la “visione a tunnel” con la quale si perde la visione periferica per concentrarsi verso un'unica direzione di fuga (es. porta di uscita del capannone) che dovrebbe essere libera da ostacoli (e non investita da una fonte luminosa intensa e diretta) per evitare la reazione di immobilità dell'animale che comporta un'ulteriore peggioramento delle condizioni fisiopatologiche derivanti dallo stress.



**Figura 6:** Rottura vasi capillari  
**Figure 6:** Capillary hemorrhage



**Figura 7:** Venature  
**Figure 7:** Veins



**Figura 8:** Bitonalità, simil-pse  
**Figure 8:** Bitonality, similar -pse

Per quanto riguarda la rottura dei vasi capillari e le conseguenti microemorragie puntiformi nella massa muscolare, la causa può essere spiegata con due teorie che possono essere anche complementari nella manifestazione del difetto.

1. Teoria pressoria : lo stress (stordimento elettrico, abuso della pila durante la movimentazione) determina la vasocostrizione arteriosa ma i capillari rimangono distesi e privi di sangue. Superato l'evento stressante, le arteriole si dilatano, il sangue torna copioso nei capillari che, resi già più permeabili per la precedente ipossia, vanno incontro a emorragia per ressi o diapedesi. Durante la macellazione è quindi

importante che il tempo che intercorre tra lo stordimento e il dissanguamento sia più breve possibile per impedire o ridurre il picco pressorio e la conseguente dilatazione capillare.

2. Teoria meccanico – contrattile: lo stress (pila) determina la reazione di fuga, i movimenti bruschi e improvvisi provocati da una eccessiva contrazione delle miofibrille sottopongono i vasi capillari a forte tensione che possono comportare rotture. ( P.S. Marcato).

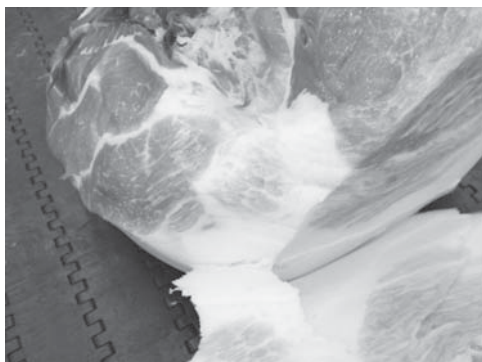
Le venature invece sono uno dei difetti più difficili da spiegare e da controllare, da ciò la complementarità di più cause. Generalmente emergono dopo la fase di raffreddamento (circa 24 ore dopo la macellazione) e riguardano soprattutto il piatto mediale della coscia. Qualora emergano anche sul lato laterale rendono la coscia e la partita problematica perché in questi casi la percentuale del difetto è elevata (4-5% circa). Le cause sono varie e personalmente ho notato che i primi caldi estivi possono influire negativamente determinando un incremento del difetto. In particolare si ipotizza che il digiuno precarico, la disidratazione e il conseguente aumento del valore dell'ematocrito potrebbero determinare un cattivo dissanguamento con accumulo di sangue a livello dei vasi cutanei. Il difetto incrementa anche con l'aumento della durata della fase di carico e trasporto, con lo stordimento elettrico e con l'aumento del tempo di pre-refrigerazione. Animali provenienti dallo stesso allevamento e macellati contemporaneamente in impianti diversi manifestano percentuali diverse del difetto confermando che le diverse modalità di macellazione influiscono direttamente.

La carnosità della carcassa rimane comunque uno dei parametri più influenti sul problema (Russo et al. 2003), più le carcasse risultano magre più facilmente il problema delle venature emerge anche con gravità medio-alta (sia lato mediale che laterale).

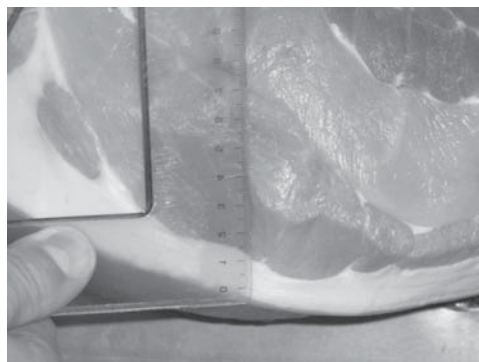
Il difetto della bitonalità con manifestazione di carni simil-pse (pallide , soffici ed essudative) come detto precedentemente trova la spiegazione nella diversa percentuale di fibre bianche o rosse che compongono i vari distretti muscolari. Questi sono anche vascolarizzati in modo diverso con contenuto variabile di mioglobina determinando così la classica colorazione scura nella massa muscolare centrale (quadricipite femorale) in contrapposizione a quella più chiara e lucente (per essudazione) del bicipite femorale e semitendinoso più esterni.

### **DIFETTOSITA' GESTIONALI/GENETICHE**

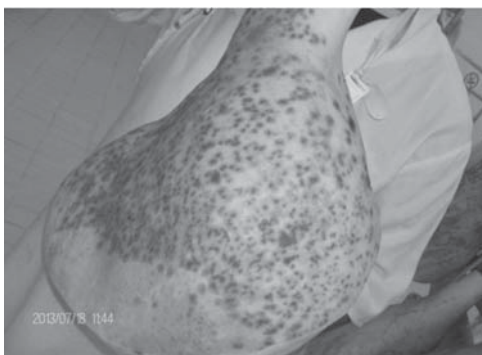
All'interno di questo gruppo troviamo difetti di origine variabile : alcuni derivanti da errori gestionali spesso espressione di una base genetica (grassinatura, spessore grasso insufficiente i cosiddetti “magroni”), altri tipici di alcune zone per la localizzazione dell'allevamento (zanzare in zone particolarmente umide) oppure tipici di alcuni allevamenti per le proprie particolarità strutturali (irritazioni cutanee in animali allevati su pavimentazioni piene perennemente sporche).



**Figura 9:** Grassinatura  
**Figure 9:** Fat infiltration



**Figura 10:** Spessore grasso insufficiente  
**Figure 10:** Insufficient fat thicknes



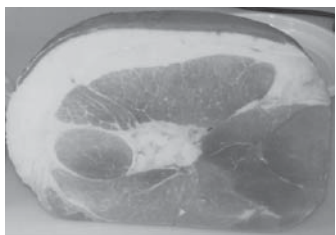
**Figura 11:** Punture di zanzare  
**Figure 11:** Mosquito bites



**Figura 12:** Irritazione cutanea  
**Figure 12:** Skin irritation

La grassinatura è uno dei difetti più temuti, sicuramente trova la sua espressione da una base genetica e si evidenzia più facilmente a seguito di errori alimentari (eccessi energetici e/o squilibri del rapporto energia-proteina) soprattutto nei maschi castrati e in particolari periodi dell'anno (inverno). Il deposito adiposo che sta alla base della difettosità è stimolato dal fotoperiodo (minor ore di luce e le variazioni climatiche inducono nell'animale un sostanziale cambiamento metabolico-ormonale con maggior sensibilità cellulare all'insulina che facilita la permeabilità dei grassi) e dal minor movimento. Al contrario, è difficile evidenziarla nel periodo estivo poiché l'animale fisiologicamente non necessita di accumuli adiposi e soprattutto perché tende ad una minor ingestione alimentare per le alte temperature. Schematicamente il difetto può essere distinto in tre diverse espressioni:

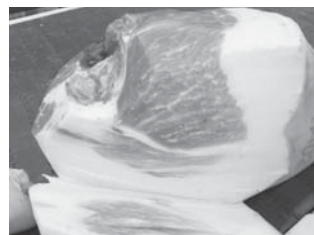
1. Marezzatura eccessiva : è un infiltrazione di grasso che si rende visibile con striature di varie dimensioni ( Silviotti, 1989);
2. Grassinatura o distrofia lipomatosa : è una forma quasi patologica in cui si ha atrofia delle miofibrille alla quale si accompagna una infiltrazione intramuscolare di tessuto adiposo che si sostituisce a porzioni significative del muscolo bicipite femorale e semitendinoso ( Silviotti, 1989);
3. Noce di grasso : è un difetto che si evidenzia nella porzione centrale della coscia, a forma di fuso si colloca caudalmente al femore e raggiunge la sua massima estensione tra il terzo medio e il terzo prossimale.



**Figura 13:** Marezzatura  
**Figure 13:** Fat infiltration



**Figura 14:** Distrofia lipomatosa  
**Figure 14:** Lipomatous dystrophy



**Figura 15:** Noce di grasso  
**Figure 15:** Fat nut

Quando la base genetica è particolarmente influente è facile rilevare il difetto di infiltrazione grassa anche in altri distretti anatomici (*longissimus dorsi*), rendendo poco commerciabili i tagli freschi derivati.

Per quanto riguarda le cosce, tale difetto soprattutto nel periodo più sfavorevole dell'anno (fine inverno) può determinare un declassamento superiore al 5%.

I difetti invece del magro cioè di una insufficiente copertura adiposa sia del lato mediale (corona) che di quello laterale sono più facilmente riscontrabili su animali di sesso femminile. Sono tipici di razze molto performanti che esprimono alla classificazione post macellazione elevate percentuali di carne magra soprattutto se errori alimentari con diete povere di energia non hanno controbilanciato questa particolarità. La copertura adiposa è l'unica barriera che preserva la massa magra in stagionatura dai processi ossidativi per cui la sua presenza è fondamentale per preservare tutti i processi biochimici ed enzimatici che porteranno ad un prodotto di qualità. Anche se il disciplinare già vincola la coscia fresca al rispetto della presenza di una copertura di grasso minima di circa 20 mm per la parte esterna (misurata verticalmente in corrispondenza della testa del femore "sottonoce" vedi fig. 10) e in "corona" tale da impedire il distacco della cotenna dalla parte muscolare sottostante, commercialmente ormai sono molto più richieste cosce che presentano almeno 30 mm esterni e 10 -15 mm in corona. Inoltre come detto precedentemente la copertura di grasso se ben presente attenua molto l'evidenza di altri difetti come gli ematomi ma soprattutto è statisticamente provato che diminuisce drasticamente il risalto delle venature soprattutto in corona. Quando si parla di grasso di copertura bisogna anche ricordare le caratteristiche qualitative del grasso: deve avere una composizione con bassa presenza di acido linoleico tale da determinare un valore del N° di Iodio < 70.

Senza entrare in merito alla problematica ben esposta da esperti nutrizionisti in vari lavori che si trovano in bibliografia ricordo solo che tendenzialmente le cosce magre rilevano più facilmente valore del numero di Iodio non conforme. Il difetto del magro, a secondo della linea genetica e del periodo di macellazione, valutato complessivamente insieme alla classificazione EUROP (con esclusione delle carcasse HE che presentano più del 56,6% di carne magra) può determinare uno scarto anche superiore al 10%.

Per concludere il discorso dei difetti con influenza genetica (grassinatura e magroni), in base alla mia esperienza mi sento ormai sicuro di affermare che questi non possono più essere attribuiti solo alla linea maschile, come una volta si sosteneva, ma la linea femminile gioca un ruolo di grande importanza. Nella scelta genetica vanno ponderate correttamente entrambi considerando la possibilità che l'incrocio commerciale di ibridi diversi potrebbe far emergere difetti che le linee ibride pure non presentano.

Tra i difetti gestionali non influenzati dalla genetica ho portato come esempio le punture di zanzare e le dermatiti conseguenti alla pavimentazioni non curate. Le punture di zanzare naturalmente in estate e in particolari zone umide (risaie) determinano scarti inimmaginabili



(anche oltre il 20%) che in determinate giornate possono pregiudicare l'evasione degli ordini diretti ai prosciuttifici. E' per questo motivo che qualora si macelli animali a rischio è bene non vincolare la produzione giornaliera dei reparti di rifilatura cosce su tali animali ma bensì programmare ritiri e macellazioni di suini provenienti da zone non a rischio in modo da limitare la numerosità delle cosce difettose nella giornata lavorativa. Sono danni causati dalla *Culex pipiens* (zanzara comune) che colonizza in maniera predominante le aree umide e/o a vocazione risicola impedendo contemporaneamente lo sviluppo del genere *Aedes* (zanzara tigre) non ancora ritenuta causa di tali problematiche. Purtroppo quando l'infestazione è massima si determinano danni che portano allo spolpo completo della coscia, le punture oltre a deprezzare visibilmente la cute (vedi fig. 11) ne impediscono un utilizzo diverso (prosciutti cotti) poiché la reazione è tale da evidenziare il "cono infiammatorio" anche nel pannicolo adiposo sottocutaneo per diversi mm di profondità (vedi fig. 15, 16).



**Figura 15:** Punture zanzare grasso sottocute  
**Figure 15:** Mosquito bites subcutaneous fat



**Figura 16:** Punture zanz. "cono infiammatorio"  
**Figure 16:** Mosquito bites "inflammatory cone"

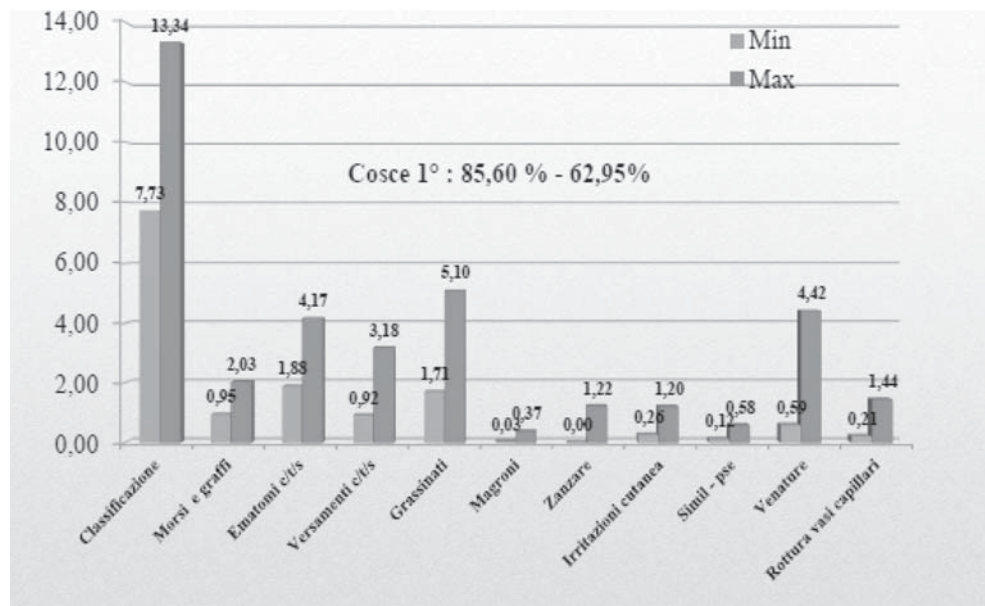
In merito, l'esperienza è tale da affermare che in determinate aree l'unico modo per la risoluzione del problema è ricorrere alla ventilazione forzata con la completa chiusura dei capannoni, ogni altra soluzione porterà solo a risultati insoddisfacenti e/o rischiosi!!!

Le dermatiti che si evidenziano post- macellazione con arrossamenti cutanei (vedi fig. 12) sono invece conseguenti alla stabulazione su pavimentazioni piene mal curate. Gli animali sono perennemente a contatto con feci e urine. La presenza di ammoniaca e urea irrita la cute causando una reazione infiammatoria tale da comprometterne le cosce dopo la macellazione. Generalmente la lesione è monolaterale per l'abitudine dell'animale a coricarsi sempre sullo stesso fianco e già in vita è rilevabile un'area di alopecia nel punto di contatto con il pavimento. Tale difetto non va confuso con errori di macellazione (temperature eccessive delle acque delle vasche di depilazione, eccessiva temperatura vapore sauna, errori di flambatura, ecc.) perché in questo caso gli arrossamenti sono su entrambe le cosce e sul lato mediale che invece in vivo non è a contatto con la pavimentazione sporca.

## CONCLUSIONI

Per concludere ripropongo in veste grafica i valori di scarto ( % cosce con difetto) che si potrebbero evidenziare durante la macellazione del nostro suino tipico italiano, considerando che in termini economici per il macello fa una differenza sostanziale poter inviare alla stagionatura circa 85% delle cosce rispetto al valore prossimo al 63%, soprattutto in particolari momenti di mercato. Se consideriamo i conteggi economici fatti all'inizio e la capacità produttiva di un tipico impianto industriale italiano che mediamente processa 3.000

suini Dop giornalieri produrre il 22% in meno di cosce di prima equivale ad una mancata redditività di circa 25.000 euro/giorno !!!.



Detto ciò è fondamentale che tutti gli attori della filiera si rendano conto dell'importanza del valore delle cosce e soprattutto mettano in atto tutte le procedure gestionali/strutturali per salvaguardare tale aspetto. Anche in questo caso la continua formazione del personale (allevatori, trasportatori, personale delle stalle di sosta, macellatori) rimane un ottimo punto di partenza da non sottovalutare. Visite nei reparti di rifilatura cosce fatti da allevatori che il giorno prima hanno caricato i propri suini sono indispensabili per renderli partecipi delle problematiche soprattutto relativi a difetti come gli ematomi che si potrebbero facilmente evitare.

## BIBLIOGRAFIA

1. Marcato P.S. (1998) " Patologia Suina" Testo e Atlante, Edagricole – Bologna.
2. Ismea (2018) "Costo di Macellazione dei suini : indagine 2016" in "Piano Zootecnico Osservatorio Economico – Gennaio 2018".



## ATTI DEL XLVI MEETING ANNUALE

*Pescantina (VR), 19-20 Marzo 2020*

(Evento annullato causa emergenza COVID-19)





## IMPLICAZIONI ALIMENTARI NELLA ESPRESSIONE DI ALCUNE PATOLOGIE ENTERICHE DEL SUINO

### HOW FEEDING CAN BE IMPLICATED IN THE DEVELOPMENT OF SOME ENTERIC DISEASES OF THE PIC

BARDINI R.

*Trouw Nutrition Italia*

La crescita della popolazione mondiale nei prossimi anni causerà un incremento globale della richiesta di proteina animale ; in conseguenza carne, latte ed uova potranno soddisfare questi aumentati fabbisogni solo se di concerto aumenterà la efficienza produttiva degli allevamenti. Questa aumentata produttività, che non potrà che derivare dall'allevamento intensivo, comporterà, soprattutto nei mercati “emergenti” e presumibilmente meno nei cosiddetti mercati “maturi”, una disponibilità di maggiori volumi di proteine di origine animale , che cresceranno di pari passo con il rischio di un incrementato utilizzo di antibiotici nelle aziende zootecniche. Questo scenario però cozza contro la richiesta globale di una riduzione dell'uso di antimicrobici, al fine di limitare la insorgenza di batteri antibiotico resistenti ed a tutela dell'ambiente (i metalli pesanti come lo zinco ossido, oltre ad aumentare la polluzione del suolo, contribuiscono anch'essi ad accrescere le resistenze batteriche agli antimicrobici stessi). In questa ottica ogni strategia (gestionale, ambientale, vaccinale ed alimentare, in una visione di approccio integrato) che possa migliorare la salute degli animali ed evitare che gli stessi siano preda di patologie è sicuramente più che benvenuta, e personalmente credo che a questo proposito la nutrizione possa giocare un ruolo estremamente importante. Vorrei quindi dimostrare come, nell'ambito dell'allevamento industriale, una corretta alimentazione possa influenzare non solo le prestazioni zootecniche ma anche la comparsa o meno o la gravità di alcune forme enteriche, in modo diverso, sia nei suinetti che nei soggetti adulti.

**Suinetti:** la fase più delicata è quella dello svezzamento: il passaggio da una alimentazione liquida (latte) ad una secca (mangime), combinato con lo stress del cambio ambientale, formazione di gruppi e vaccinazioni rende i soggetti particolarmente recettivi agli insulti batterici. In questa fase anche la fisiologia non ci aiuta: non dimentichiamo che il pH gastrico del suinetto, a differenza dell'adulto dove è inferiore a 4, si posiziona tra 5 e 6; si evidenzia quindi un peggioramento della prima degradazione proteica, associata ad un aumentato transito verso il lume intestinale di ceppi microbici patogeni tra i quali Coli e Clostridi. Il comandamento fondamentale in questa fase è *mantenere la ingestione il più possibile elevata e continuativa* , evitando lo stop alimentare; a questo proposito dobbiamo ricordare che anche la corretta ingestione di acqua incide molto sulla fagia, nel senso che un animale che beve molto mangia di più. Un elevato livello di ingestione contribuisce a mantenere la barriera intestinale integra ed evitare che tossine e batteri, attraversando le tight junction scollate (sistemi proteici di blocco che nella norma mantengono gli enterociti adesi tra loro, formando un vero e proprio primo meccanismo di difesa), passino nel torrente ematico contribuendo a instaurare e prolungare il processo infiammatorio. Nella pratica se osserviamo nel post svezzamento il comportamento alimentare dei suinetti, all'interno dei gruppi abbiamo due diversi tipi di atteggiamenti: alcuni soggetti appena svezzati non si alimentano anche per 48 ore di seguito, mentre altri di loro partono velocemente ad ingerire mangime ma successivamente soffrono della cosiddetta “seconda caduta di ingestione” che compare tra 4 e 6 giorni post svezzamento (spesso complicata da infezioni da E. Coli causate dal precedente overfeeding).

Per mantenere quindi l'ingestione costante si applicano alcune strategie nutrizionali che riguardano ovviamente la composizione dei mangimi e la scelta degli alimenti; fondamentale è la determinazione della palatabilità delle diverse materie prime (intesa come gusto ed olfatto insieme), la digeribilità delle stesse, la forma fisica di presentazione, la assenza di tossine o contaminanti indesiderati. Non dimentichiamo la gestione delle mangiatoie ed il diverso livello di ingestione a seconda dei sistemi di distribuzione dell'alimento (a cassetta, a bagnato razionato o a volontà, la possibilità dei suinetti di vedersi l'un l'altro durante il pasto, la neofobia riferita ad un ambiente completamente nuovo).

Nella corretta formulazione di una dieta di transito e post svezzamento la *proteina* è uno dei fattori chiave: se permettiamo che un sovraccarico di proteina indigerita transiti alla fine del piccolo intestino e termini nel grosso intestino, unitamente alla quota di proteina endogena del muco, enzimi endogeni e cellule di desquamazione, sicuramente ritroveremo una aumentata proliferazione di batteri come E. Coli e Clostridi, associata ad un aumento di ammoniaca (dotata essa stessa di effetto tossico sugli enterociti). Il nutrizionista è quindi obbligato alla scelta di fonti proteiche molto digeribili, ma non dimentichiamo che oltre alla digeribilità anche la quantità totale di proteina giornaliera ingerita gioca un ruolo primario, nel senso che è stato dimostrato estremamente utile non superarne i 40\60 grammi giornalieri nei primi giorni post svezzamento.

Approfondendo l'argomento ed affrontando la composizione in *aminoacidi* della dieta, è necessario ricordare come il sistema di calcolo dei fabbisogni in aminoacidi digeribili, che pure fu un punto di svolta nella determinazione di una migliore efficienza alimentare, si basi sull'accrescimento muscolare di suini di circa 40 kg di peso e non tenga in alcuna considerazione la diversa esigenza in composizione aminoacidica della dieta finalizzata alla produzione di anticorpi e di mediatori della infiammazione da parte di un soggetto stressato o preda di una infezione: se analizziamo meglio la composizione aminoacidica di alcune proteine infiammatorie o del muco ciliare dell'intestino (fondamentale come prima protezione dell'intestino), ci accorgiamo che il fabbisogno in aminoacidi varia notevolmente soprattutto se ci concentriamo sul rapporto standardizzato tra di essi, considerando che nella normalità si lavora con una dieta basata sul rapporto tra di loro con la finalità di accrescimento muscolare; la meta analisi ha dimostrato come questo nuovo approccio nel rapporto fra aminoacidi abbia prodotto minore mortalità e migliori accrescimenti in soggetti infettati da ceppi di E. Coli patogeni rispetto ad una dieta standardizzata per il solo accrescimento muscolare.

Anche la *fibra* come componente alimentare gioca un ruolo importante nella espressione delle patologie enteriche: in realtà, come nei ruminanti, è necessario considerarla nelle sue diverse componenti, che hanno comportamenti diversissimi : fermentescibilità, capacità di legare i sali biliari, velocizzare o rallentare il transito intestinale o lo svuotamento gastrico variano enormemente, a parità di fibra totale, in base alla loro suddivisione in frazioni . Addirittura si sta prendendo in considerazione un aumento del livello di fibra , in particolare la frazione a lenta degradazione e poco fermentescibile, anche in pre svezzamento (con questo approccio il peso dell'intestino del suinetto e la sua lunghezza saranno maggiori all'uscita dalla sala parto). La finalità è quella di fare arrivare più fibra in maggiore quantità nel grosso intestino e lì determinarvi una differente crescita microbica, soprattutto nella frazione di batteri utili ed antagonisti alla crescita di quelli patogeni. Questo nuovo approccio deriva da un nuovo concetto alimentare indicato come “ cinetica della digestione”, applicato in Nord Europa come progetto sperimentale ed applicato in campo da uno dei più grandi produttori olandesi di mangimi : in pratica si tratta di dare una valutazione (numerica) ad ogni alimento di quanto velocemente si degradino sia la fibra che la proteina (la velocità di digestione dell'amido invece risulta influente sulla comparsa di patologia enterica). La proteina dovrebbe degradarsi il più velocemente possibile in modo da fare oltrepassare in minima quantità la

valvola ileo cecale, mentre la fibra (attenzione, solo nella prima fase del post svezzamento!) dovrebbe passare indigerita o quasi nel grosso intestino: di seguito, superata la fase critica di post svezzamento, diciamo al massimo due settimane dopo, la fibra del mangime dovrebbe tornare fermentescibile per produrre acidi grassi volatili, fonte energetica essenziale per un miglioramento delle performances zootecniche.

Al di là della composizione come materie prime, la aggiunta di *additivi* rimane uno dei pilastri del mantenimento dello stato di salute dell'intestino, non solo del giovane ma anche del suino adulto. Ormai arcinota è la attività degli acidi grassi a corta (SCFA) e media (MCFA) catena: i primi contribuiscono a controllare la crescita dei batteri Gram negativi penetrando all'interno dei batteri e provocandone la distruzione, mentre i secondi sono in grado di disintegrare la parete dei batteri Gram positivi, ed eventualmente farvi penetrare gli SCFA. Una combinazione di entrambi è sicuramente la scelta vincente. I beta glucani attraverso il potenziamento della risposta immunitaria possono giocare un importante ruolo, così come alcuni oligosaccaridi che captano le Enterobacteriacee, velocizzandone la espulsione. Altri prebiotici sia direttamente addizionati all'alimento o ricreati attraverso una attività enzimatica favoriscono la formazione di oligosaccaridi dotati della capacità di far deviare la popolazione microbica del GIT a vantaggio di batteri non patogeni.

L'*acqua*, il cosiddetto alimento dimenticato, deve essere presa in serissima considerazione sia in quantità che in qualità: al di là della attenzione al numero di succhiotti adeguati per numerosità del gruppo, un modo per garantirne buona qualità microbiologica ed aumentarne l'ingestione migliorandone la appetibilità è quello di procedere alla sua acidificazione. Abbassandone il pH (con prodotti a base di formiato di ammonio o di sodio) si fornisce un alimento sanitariamente sicuro e molto più appetibile. Allo stesso modo dell'acqua, anche le *materie prime* possono essere fonti di rischio fisico, chimico o microbiologico; se il nutrizionista utilizza i loro valori standard nella composizioni del mangimi, non deve dimenticare la valutazione reale di quanto ha nel proprio stoccaggio, soprattutto riguardo le tossine o la presenza di fattori antinutrizionali. La "nutrizione di precisione" è una sfida che non tocca solamente i valori nutrizionali e quindi i risultati zootecnici, ma anche lo stato sanitario e l'insorgenza delle patologie.

Nel **suino in accrescimento ingrasso** cambiano le patologie ma i concetti visti sopra sono più o meno gli stessi, con qualche differenza sostanziale; mentre abbiamo a disposizione numerosissimi studi sulle forme enteriche nel post svezzamento, a livello bibliografico nelle enteriti dell'accrescimento\ingrasso si trovano pochi lavori e contraddittori. Cambiano i patogeni: Lawsonia e Brachyspire, a volte con la straordinaria partecipazione delle Salmonelle ..... ma i concetti di cinetica della digestione di fibre e proteina restano praticamente identici, con la differenza che mentre la quota di amido e zuccheri era ininfluente sulla comparsa di enteriti da Coli nei suinetti, nel suino adulto a livello della loro presenza più o meno massiccia nell'ileo e nel grosso intestino possiamo aspettarci maggiore o minore gravità della clinica e delle lesioni anatomopatologiche. Ad esempio anche nel caso di infezione da Brachyspira maggiore è la quantità di proteina che sfugge alla digestione nel piccolo intestino e finisce nel colon, maggiore sarà la sua crescita: consideriamo che questo patogeno produce ben 15 proteasi che, agendo sulle catene peptidiche indigerite a monte, favoriscono la sua crescita soddisfacendo il proprio fabbisogno appunto in proteina. Allo stesso modo la fibra indigeribile, ad elevato contenuto di NSP o polisaccaridi non amidacei, una volta raggiunto il grosso intestino concorre ad aumentare la proliferazione del germe (vedi l'aumento dei casi clinici negli USA legata alla disponibilità a basso costo dei DDGS): in teoria una dieta a base di mais, riso e sorgo, con amido velocemente digerito, è preferibile ad una dieta a base di orzo e frumento. Da evitare il siero di latte che, chemoattraente per Brachyspira,

risulta deleterio per un suino infetto; siero che sembra invece essere utile nel controllo della espressione di patologia da Lawsonia, allo stesso modo dei DDGS, dell'acido lattico al 2,4% della dieta e della somministrazione di mangime macinato in farina rispetto al pellet.

Anche la haemorrhagic bowel syndrome è correlabile alla alimentazione: quella che viene comunemente definita come "Clostridiosi", soprattutto in suini alimentati a bagnato ma a volte segnalata anche in animali gestiti a secco, colpisce soggetti nelle fasi di accrescimento ingrasso provocando perdite preoccupanti in termini di morti improvvise. Come già riportato sopra riguardo alla qualità e sanità delle materie prime, la causa primaria è da ricercarsi nella contaminazione di lieviti nella broda o negli alimenti: si consiglia di non superare 100.000 UFC/gr nei singoli alimenti e 1.000.000 UFC/gr nei mangimi finiti. Non dobbiamo però dimenticare di curare particolarmente l'igiene degli impianti di distribuzione a broda: lavorando sui contenitori di acqua di lavaggio/recupero degli impianti o igienizzando le linee di trasporto dell'alimento (con l'aggiunta di specifici ceppi batterici o attraverso un trattamento a base di acidificanti con attività antifermentativa come formiato o propionato) siamo in grado di limitare i danni.

In conclusione mi sento di affermare che le competenze del nutrizionista collegate alle competenze veterinarie possono insieme contribuire in modo valido al contenimento delle patologie enteriche e collaborare sinergicamente ad una riduzione dell'uso massiccio di antimicrobici, sempre nell'ambito di un approccio olistico che consideri come un unicum animale, alimento, ambiente, management e gestione sanitaria.

Ringraziamenti: colgo l'occasione per ringraziare il collega Ruben Decaluwe per avermi fornito parte del materiale da cui ho attinto le informazioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allaart J, Roubos-van den Hil P, D'heer B, Smits C 2017. New innovative feeding strategy for reduction of Salmonella in swine. 12th International Symposium on the Epidemiology and Control of Biological, Chemical and Physical Hazards in Pigs and Pork
2. Aumaitre A, Peiniau J, Madec F 1995. Digestive adaptation after weaning and nutritional consequences in the piglet. *Pig News and Information* 16, 73-79.
3. Burrin, D. 2010. Role of nutrition and intestinal adaptation in weanling pig health. *Proceedings of the 21th IPVS Congress*, Vancouver, Canada, 11-12.
4. De Busser EV, Dewulf J, De Zutter L, Haesebrouck F, Callens J, Meyns T, Maes W, Maes D 2011. Effect of administration of organic acids in drinking water on faecal shedding of E. coli, performance parameters and health in nursery pigs. *The Veterinary Journal* 188, 184-188.
5. Desbois AP, Smith VJ 2010. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiological Biotechnology* 85, 1629-1642.
6. Edelblum KL, Turner JR 2009. The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown. *Current opinion in pharmacology* 9(6), 715-720.
7. Glaser D, Wanner M, Tinti JM, Nofre C 2000. Gustatory responses of pigs to various natural and artificial compounds known to be sweet in man. *Food chemistry*, 68, 375-385.
8. Glaser D, Wanner M, Tinti JM, Nofre C 2001. Pig responses to taste stimuli. *Chemical signals in vertebrates* 9, edited by Marchlewska-Koj et al. Kluwer Academic Publishers, New York.
9. Gloaguen M, Le Floc'h N, van Milgen J 2013. Couverture des besoins en acides aminés chez le porcelet alimenté avec des régimes à basse teneur en protéines. *INRA Prod. Anim.*, 26: 277-288.

10. Grahofer A., Nathues H., Overesch G., Zeeh F. Effect of soy on faecal dry matter content and excretion of *Brachyspira Hiodysenteriae* in pigs of different ages
11. Groschwitz KR, Hogan SP 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 124(1), 3-20.
12. Heo JM, Kim JC, Yoo J, Pluske JR 2015. A between-experiment analysis of relationships linking dietary protein intake and post-weaning diarrhea in weanling pigs under conditions of experimental infection with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Science Journal* 86: 286-293.
13. Hopwood DE, Pethick DW, Hampson DJ 2002. Increasing the viscosity of the intestinal contents stimulates proliferation of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Brachyspira pilosicoli* in weaner pigs. *British Journal of nutrition* 88(5), 523-532.
14. Jaworski NW, Simard F, Leduc M, Ramaekers P, Fledderus J, Ferguson NS 2019. Utilizing in vitro protein digestion kinetics and resistant fiber to steer ingredient composition of nursery pig diets for reduced risk of post-weaning diarrhea. *Proceedings of Zero Zinc Summit, Copenhagen, Denmark.*
15. Kim JC, Hansen CF, Mullan BP, Pluske JR 2012. Nutrition and pathology of weaner pigs: Nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology* 173(1-2), 3-16.
16. Kim JC, Heo JM, Mullan BP, Pluske JR 2011. Efficacy of a reduced protein diet on clinical expression of post-weaning diarrhoea and life-time performance after experimental challenge with an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Animal Feed Science and Technology* 170, 222-230.
17. Le Floch N, Melchior D, Obled C 2004. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livestock Production Science* 87, 37-45.
18. Lin HC, Visek WJ 1991. Colon mucosal cell damage by ammonia in rats. *The Journal of nutrition* 121, 887-893.
19. Marchiando AM, Graham WV, Turner JR 2010. Epithelial barriers in homeostasis and disease *Annu Rev Pathol.* 5:119-44.
20. Mudd AT, Alexander LS, Berding K, Waworuntu RV, BergBM, Donovan SM, Dilger RN 2016. Dietary prebiotics, milk fat globule membrane, and lactoferrin affects structural neurodevelopment in the young piglet. *Front. Pediatr.* 4, 4.
21. Nofre C, Glaser D, Tinti JM, Wanner M 2002. Gustatory responses of pigs to sixty compounds tasting sweet to humans. *Journal of animal physiology and animal nutrition* 86, 90-96.
22. Pluske JR, Hampson DJ, Williams IH 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science* 51, 215-236.
23. Pluske JR, Kerton DK, Cranwell PD, Campbell RG, Mullan BP, King RH, Power GN, Pierzynowski SG, Westrom B, Rippe C, Peulen O, Dunshea FR 2003. Age, sex weight at weaning influence organ weight and GI development of weanling pigs. *Australian j. Agric. Res.* 54: 515-527.
24. Pluske JR, McDonald DE, Pethick DW, Mullan BP, Hampson DJ 2001. Nutritional management of the gastrointestinal tract to reduce enteric diseases in pigs. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 13, 127-134.
25. Pluske John R.\*, Pethick David W., Hopwood Deborah E. and Hampson David J. Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs Division of Veterinary and Biomedical Sciences, Murdoch University, Murdoch, WA 6150, Australia

26. Pluske J.R., Siba P.M., Phethik D.W, Mullan B.P., Hampson D.J. Reduced incidence on swine dysentery in pigs fed diets that were selected or processed to have reduced fermentation in the large intestine .
27. Reeds PJ, Jahoor F 2001. The amino acid requirements of disease. *Clinical Nutrition* 20, 15-22.
28. Resink, J. W., and H. van Hees. 2014. The influence of pre-weaning exposure to soybean meal and increasing levels of soybean meal after weaning or soybean oligosaccharides on piglet performance, gastrointestinal passage rate and diarrhoea score after weaning. SRC internal report P249. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. 2014.
29. Rist VTS, Weiss E, Sauer N, Mosenthin R, Eklund M 2014. Effect of dietary protein supply originating from soybean meal or casein on the intestinal microbiota of piglets. *Anaerobe* 25, 72-79.
30. Sangild PT 2006. Gut Responses to Enteral Nutrition in Preterm Infants and Animals. *Experimental Biology and Medicine* 231, 1695-1711.
31. Schiering C, Krausgruber T, Chomka A, Fröhlich A, Adelmann K, Wohlfert EA, Pott J, Griseri T, Bollrath J, Hegazy AN, Harrison OJ, Owens BMJ, Löhning M, Belkaid Y, Fallon PG, Powrie F 2014. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature*. 513 (7519), 564-568.
32. EFSA 2014. Scientific Opinion on the potential reduction of the currently authorised maximum zinc content in complete feed. *EFSA Journal*, 12 (5), 3668
33. Sola-Oriol. 2008. Quantitative evaluation of the palatability of feed ingredients in swine. Phd dissertation. Faculty of Veterinary Medicine, AUB, Bellaterra, Spain.
34. Turner JR 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 9 (11), 799-809.
35. Vahjen W, Pietruszynska D, Starke IC, Zentek J 2015. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathog* 7, 23.
36. Walsh MC, Sholly DM, Hinson RB, Saddoris KL, Sutton AL, Radcliff JS, Odgaard R, Murphy J, Richert BT 2007. Effects of water and diet acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding. *Journal of Animal Science* 85, 1799-1808.
37. Wilberts Bailey L. 1, Arruda Paulo H. 2, Kinyon Joann M. 2, Frana Tim S. 2,
38. Wang Chong2, Magstadt Drew R. 2, Madson Darin M. 2, Patience John F. 3, Burrough Eric R2 \* Investigation of the Impact of Increased Dietary Insoluble Fiber through the Feeding of Distillers Dried Grains with Solubles (DDGS) on the Incidence and Severity of *Brachyspira*-Associated Colitis in Pigs
39. Williams N, Stahly T, Zimmerman D 1997. Effect of chronic immune system activation on the rate, efficiency, and composition of growth and lysine needs of pigs fed from 6 to 27 kg. *Journal of Animal Science* 75: 2463-2471.
40. Williams BA, Verstegen MW, Tamminga S 2001. Fermentation in the large intestine of single-stomached animals and its relationship to animal health. *Nutrition research reviews* 14: 207-228.



# VENTILAZIONE E BENESSERE SUINO

## VENTILATION AND PIG WELFARE

ESCOBET RIU J.

*Confort porcino. Spagna*

[www.confortporcino.com](http://www.confortporcino.com)

La diagnosi e il controllo dei fattori di rischio ambientale rappresentano una sfida attuale e futura per la moderna produzione suinicola. Una gestione sbagliata delle condizioni ambientali comporta una compromissione del benessere dei suini, una maggiore incidenza di processi patologici e una riduzione delle performance produttive. La gestione dei fattori ambientali è ancora più importante nella moderna suinicoltura, considerati soprattutto la sempre maggiore spinta verso un corretto uso degli antibiotici e il rispetto di requisiti di benessere più rigorosi.

Il concetto di controllo ambientale è più ampio di quanto si pensi. In generale, si riferisce alla diagnosi e alla gestione di condizioni esterne o fattori ambientali che incidono sul benessere, la salute e la produzione dei suini. Le condizioni ambientali che influiscono sull'allevamento suino non sono limitate al solo sistema di ventilazione, esistono anche fattori di gestione (persone), fisici (strutture), climatici (aria) e sociali (suini). Questi fattori sono correlati tra loro, e i suini e l'ambiente non possono essere separati, ma si può modificare l'ambiente per renderlo più confortevole per i suini. Infatti, quando viene diagnosticato un problema, solitamente non è dovuto a un singolo fattore, ma piuttosto a una sindrome ambientale. L'interazione tra le strutture e i fattori di rischio ambientale determinerà il comfort dei suini. La temperatura dell'aria come singolo fattore è un argomento insufficiente per determinare il comfort; quando diagnosticiamo una sindrome ambientale, dobbiamo anche introdurre il concetto di temperatura effettiva dell'ambiente del maiale.

Lo scopo delle apparecchiature per il controllo climatico è quello di generare stabilità e comfort nell'ambiente circostante il maiale, ovvero l'uniformità ambientale e il minimo sforzo termoregolatore per il maiale, al fine di massimizzare le prestazioni produttive. Uniformità ambientale significa uniformità termica e uniformità del flusso d'aria nell'involucro termico, al fine di controllare le condizioni climatiche interne della struttura, prevenire lo stress nei suini e migliorare le performance produttive.

La ventilazione dovrebbe essere considerato uno strumento sostenibile sia a scopo preventivo, sia per mantenere la salute e il benessere dei suini. Una moderna visione strategica è quella di affrontare i problemi che compromettono il recupero dei suini attraverso una pianificazione preventiva, con una corretta diagnosi dei fattori di rischio ambientale. Oggi, il comfort dei suini può essere stimato con la tecnologia disponibile, ma è necessario conoscere quale strumento utilizzare in ciascun caso e seguire una metodologia diagnostica appropriata.

È essenziale gestire i fattori di rischio ambientale modificabili e accettare quelli che non è possibile modificare. Spesso infatti, il problema non può essere completamente risolto, e in questi casi si dovrebbe adottare un trattamento palliativo, per ridurre al minimo gli effetti negativi. Un protocollo d'azione per risolvere i problemi ambientali dovrebbe essere affrontato come se si trattasse di un caso clinico, ovvero utilizzando un approccio multifattoriale. Si dovrebbe adottare un protocollo di valutazione del sistema di controllo

climatico nella sua interezza, e allo stesso tempo implementare una strategia gestionale che consideri i miglioramenti necessari per raggiungere il confort. Tuttavia, molte volte la complessità e le interazioni tra vari fattori ambientali rendono difficile la diagnosi e la risoluzione di un problema. Non si può raggiungere un auspicato miglioramento se non si agisce in modo olistico, ovvero affrontando insieme anche la gestione, la dieta, i trattamenti, la profilassi, ecc.

Nell'analisi delle condizioni ambientali di una struttura, si deve tenere conto di quattro fattori principali: qualità dell'aria interna (clima), envelope termico (costruzione), progettazione funzionale (progettazione) e attrezzatura installata (progettazione, dimensionamento e funzionamento).

Una volta identificati i problemi, il passo successivo è risolverli, ovvero adattare la struttura e configurarla in situ per armonizzare tutti i suoi componenti. La prima decisione da prendere è quella di apportare modifiche, dal rinnovo della struttura esistente alla pianificazione di un edificio totalmente o parzialmente nuovo. Tuttavia, questo processo deve essere sempre accompagnato da un'adeguata gestione ambientale, che viene acquisita con il tempo e l'esperienza. Questo perché ogni struttura è diversa, e sebbene i problemi possano essere simili, la loro origine, evoluzione e soluzione possono essere diverse.

Mantenere il sistema perfettamente funzionante con un ambiente confortevole consente anche di ottimizzare il benessere e la produzione dei suini. Oggi esistono sistemi di valutazione e controllo che utilizzano tecnologie con software specifici per registrare e analizzare i dati a intervalli configurabili in tempo reale. Possiamo accedervi da terminali esterni e prendere decisioni rapide senza la necessità di essere presenti. Il successo di questi sistemi dipenderà dal modo in cui vengono adattati alla realtà ambientale dell'allevamento i diversi componenti, ad esempio i parametri specifici da misurare, l'installazione di sensori di qualità, il numero di sensori e dove devono essere installati per ottenere una misurazione rappresentativa, le revisioni periodiche del sistema e la calibrazione, ecc. Ma la cosa più importante sarà utilizzare tutte le informazioni ottenute per rendere la produzione più redditizia.

La professionalizzazione e la formazione continua in questo campo sono ancora in fase embrionale. I cambiamenti nella produzione a cui abbiamo assistito negli ultimi anni dovrebbero riflettersi anche a livello strutturale e ambientale. Dovrebbe essere consuetudine per le aziende del settore avere un'area specifica dedicata al controllo ambientale per controllare meglio la produzione.

È importante eseguire controlli regolari delle strutture, del comfort e dell'efficienza energetica. I certificati di qualità ambientale dovrebbero essere un ulteriore strumento per dimostrare ai consumatori che i suini vengono allevati in ambienti confortevoli e sostenibili.

# **L'ALLEVAMENTO TECNOLOGICO, IL FUTURO È ADESSO**

## ***THE TECHNOLOGICAL FARM, THE FUTURE IS IN THE NOW***

GALOFRÉ R.

*Opp group, Spain*

Negli ultimi anni, la produzione suina ha dovuto affrontare una serie di nuove sfide che vanno dall'aumento sostenuto dei prezzi delle materie prime alimentari, all'instabilità del mercato, alla difficoltà di ottenere lavoratori qualificati, alla riduzione dell'uso di antibiotici, al deterioramento di immagine associata alla mancanza di benessere degli animali e all'inquinamento ambientale.

In questo contesto, molte aziende hanno lavorato allo sviluppo di un nuovo tipo di allevamento, il più possibile conforme alle normative europee sul benessere degli animali, con un ambiente di lavoro più adeguato e, allo stesso tempo, implementando e applicando tutte le tecnologie di automazione e controllo della produzione collaudate e presenti in commercio.

Questo intervento si propone di mostrare cosa è possibile fare applicando la tecnologia disponibile e realmente utilizzabile per trovare una soluzione alle attuali sfide della produzione suina.

“Tecnologia reale per allevamenti reali” questo potrebbe essere un altro titolo per questa presentazione. Tra le tecnologie reali che possono essere applicate per un allevamento più efficiente sono comprese ad esempio: stazioni di alimentazione automatiche in gestazione e sala parto, per raggiungere migliori prestazioni; collari con antenna per rilevare il calore con efficacia; controllo elettronico climatico per una migliore salute; arricchimenti ambientali intelligenti per ridurre lo stress delle scrofe; sistemi di informazione centralizzata per una diagnosi più efficace; piattaforme integrate per una facile analisi dei dati; marchi auricolari elettronici nelle scrofe per l'identificazione individuale e il controllo individuale dell'assunzione di cibo; micronutrizione per ottenere una migliore condizione corporea; smartphone per inserire i dati in tempo reale; rilevamento di gravidanza efficace per una migliore gestione; avvisi sul consumo di acqua per rilevare possibili malattie; registro elettronico dei trattamenti per ridurre l'uso di antibiotici; distributori automatici di farmaci per un trattamento individuale adeguato; scale corrette che permettano di applicare la miglior curva alimentare per ogni singola scrofa; telecamere termografiche per valutare il benessere degli animali; microfoni per rilevare tosse, vocalizzazioni, ecc.

Tutte queste tecnologie possono essere già utilizzate nei nostri allevamenti, dobbiamo solo conoscere le loro possibilità, scegliere l'opzione più adatta e applicarla ad ogni caso specifico.



## FREQUENTI ERRORI DI MANAGEMENT

### *FREQUENT MANAGEMENT ERRORS*

GUADAGNINI G.

*PigVet, Brescia*

Le principali patologie del suino vengono spesso classificate in base alla loro eziologia e possono, quindi, essere suddivise in batteriche e virali. In questo lavoro non verrà preso in considerazione l'agente eziologico come causa primaria della malattia, ma i fattori ambientali e manageriali che possono favorire l'insorgenza di patologie.

I principali fattori predisponenti possono essere di tipo ambientale e/o alimentare ma non dobbiamo dimenticare il fattore densità animale che spesso viene considerato come parametro legato al benessere ma che, senza dubbio, ha un'importante influenza anche sulla salute animale.

Per quanto concerne i fattori ambientali, la gestione della temperatura è sicuramente un fattore rilevante in molte fasi dell'allevamento; in sala parto, ad esempio, soprattutto in inverno, risulta difficile garantire una zona sufficientemente calda per i suinetti senza avere un nido chiuso e ben riscaldato. Al momento dello svezzamento, raramente, si trova una sala con temperatura adeguata (27°C) e spesso nonostante i diversi sistemi di riscaldamento impiega 2 o 3 giorni a raggiungere la temperatura desiderata (1). Per raggiungere e mantenere le temperature nei locali dell'allevamento, si rileva frequentemente, non solo lo spegnimento della ventilazione forzata, ma addirittura la chiusura di tutte le aperture dei ventilatori con materiali vari come sacchi del mangime o copertura plastificate. Tale alterazione manuale alla ventilazione blocca totalmente il ricambio dell'aria con il risultato di creare un ambiente umido, ricco di ammoniaca e di CO<sub>2</sub>: condizioni incompatibili con una permanenza prolungata in queste sale che, tuttavia, i suini debbono fare obbligatoriamente. Anche nella fase di ingrasso si rilevano soluzioni analoghe, soprattutto al momento del ristallo: infatti, l'importante cubatura dei capannoni di ingrasso risulta difficilmente riscaldabile e l'immissione di suini tra i 25 e i 35 kg non contribuisce al riscaldamento del capannone.

Alcuni allevatori utilizzano teli per ridurre la cubatura e più spesso vengono utilizzati generatori di aria calda a gasolio. Anche in questo caso il capannone viene sigillato nel miglior modo possibile, con conseguente peggioramento delle condizioni ambientali, ulteriormente aggravato dall'eventuale utilizzo di generatori di aria calda a gasolio; infatti, alla già scarsa qualità dell'aria si aggiungono anche i fumi di scarico del generatore ad aria calda(3).

Se consideriamo l'estate i problemi climatici non sono legati alle basse temperature ma al ricambio dell'aria. La ventilazione naturale è spesso insufficiente a garantire un corretto ricambio dell'aria e un ambiente gradevole, ma i problemi maggiori si rilevano nelle strutture ad aria forzata. I fabbisogni teorici si discostano spesso da quelli reali, soprattutto se consideriamo la grande variabilità dei fabbisogni: infatti, in uno svezzamento i suini passano in 60 giorni da 6 a 35 kg e tale variabilità necessita di un impianto di ventilazione molto versatile ed efficiente che raramente si trova in campo. Spesso si rilevano impianti con controlli elettronici che hanno la possibilità di variare le impostazioni automaticamente nel tempo ma che non vengono per nulla utilizzate o non utilizzate nel modo corretto. La mancanza di manutenzione e di efficienza a lungo termine genera ambienti poco salubri per quanto riguarda la qualità dell'aria o al contrario ambienti eccessivamente ventilati,

con presenza di correnti d'aria, che possono generare nei suini problemi respiratori ed aggressività che si manifesta con fenomeni di cannibalismo alle code e/o alle orecchie (2,3).

Per quanto riguarda l'alimentazione, si rileva una grande attenzione relativamente alla scelta del mangime: le materie prime e la formulazione per quanto riguarda l'autoproduzione o la scelta del fornitore e del tipo di mangime per chi acquista il prodotto finito. Spesso sono sottovalutate le fasi successive, infatti, è altrettanto importante che il mangime venga somministrato secondo le modalità e le tempistiche corrette.

Il suinetto in sala parto si alimenta principalmente di latte prodotto dalla scrofa, ma la somministrazione di mangime sotto-scrofa aiuta il suinetto stesso a crescere meglio e a sviluppare la capacità di digestione di ingredienti vegetali. Il mangime sotto-scrofa deve essere somministrato in modo accurato, dando piccole quantità, frequentemente, in modo che il mangime sia sempre fresco e non si alteri. Talvolta il mangime viene somministrato diluito con acqua, procedura che ne favorisce l'assunzione da parte dei suinetti, già abituati ad una dieta liquida; La somministrazione con acqua fredda può generare diarrea nel suinetto e se il mangime diluito non viene consumato celermente si possono generare fermentazioni, alterazioni del mangime o proliferazione batterica.

Al momento dello svezzamento, il suinetto viene spostato in apposite stanze post-svezzamento e qui avviene il passaggio alla dieta solida. Nella maggior parte delle strutture italiane, la somministrazione del mangime avviene a secco e ad libitum. Il posizionamento, l'altezza e la forma delle mangiatoie può inibire l'assunzione del cibo, infatti, il suinetto è impaurito dall'infilare la testa nella postazione alimentare e fatica ad assumere l'alimento durante i primi giorni. Quindi, oltre allo stress del cambio ambientale ed alimentare, si somma nelle prime fasi del post svezzamento l'anoressia, che crea ipoglicemia e possibile dismicrobismo intestinale. La mancanza di pulizia delle mangiatoie potrebbe creare una compresenza di feci ed alimento, che possono favorire la diffusione di patogeni enterici. La corretta gestione delle mangiatoie è cruciale anche nel proseguo della fase post-svezzamento, infatti, la fine macinatura della farina talvolta ne impedisce lo scorrimento all'interno della mangiatoia stessa creando disparità di alimentazione tra i diversi gruppi. Talvolta il posizionamento di alcune mangiatoie non è gradito ai suinetti che ne defecano all'interno trasformando la mangiatoia in una raccolta di deiezioni.

Anche nella fase di ingrasso la corretta somministrazione del mangime risulta strategica poiché la continua sovralimentazione può creare uno stato d'inappetenza nei suini o di sovralimentazione patologica che potrebbe esitare in enterorragie. Nell'avanzo alimentare si possono rinvenire importanti fermentazioni che ne pregiudicano l'appetibilità e spesso questi avanzati si rinvergono ai lati del truogolo dove alcuni soggetti del gruppo defecano. Questo mix di alimenti fermentati e deiezioni è un ottimo terreno per l'arricchimento di patogeni intestinali.

L'acqua e la qualità dell'acqua somministrata possono essere anche fonte di patologia, alcuni abbeveratoi, mal posizionati inibiscono l'assunzione di acqua nel giusto quantitativo, deprimendo l'appetito ed aumentando la gravità delle forme enteriche. La forma di alcuni abbeveratoi anti-spreco, utilizzati al fine di far uscire poca acqua per evitare il riempimento delle fosse sottostanti, possono anch'essi deprimere il consumo di acqua. (3)

In molte fasi produttive dell'allevamento suino si rileva una profonda analisi dei dati di produzione, ma negli allevamenti si rinvergono piccole e grandi disattenzioni che favoriscono fortemente la manifestazione clinica di patologie respiratorie ed enteriche. In molti casi, massimizzare la cura dei particolari potrebbe evitare forme cliniche che attribuiamo a patogeni endemici in allevamento, i quali assumono connotati patologici solo se favoriti dalle condizioni dell'ambiente circostante.



Concludendo, la particolare cura dei dettagli ambientali ed alimentari potrebbe spesso evitare l'instaurarsi delle patologie cliniche evitando quindi inutili terapie volte a limitare l'insufficiente livello di management dell'allevamento.

#### **BIBLIOGRAFIA**

1. Bertacchini F., Campani I. (2001) "Manuale di allevamento suino" Edagricole, Bologna
2. Straw B.E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Taylor D.J. (2006) "Disease of swine" 9th edition, Blackwell publishing, Ames
3. Rossi P., Gastaldo A., Ferrari P. (2004) "Ricoveri, attrezzature e impianti per l'allevamento dei suini" Edizioni L'informatore Agrario, Verona



# **ECOSISTEMI ZOOTEKNICI DI PRECISIONE: INTEGRAZIONE DI TECNOLOGIA, PROCESSO E CULTURA**

## **PRECISION LIVESTOCK ECOSYSTEMS: INTEGRATING TECHNOLOGY, PROCESS AND CULTURE**

POLSON D.

*Boehringer Ingelheim Animal Health, Duluth, Georgia USA 30096,  
dale.polson@boehringer-ingelheim.com*

*“La prova del valore di un sistema è la sua esistenza.” (Alan Perlis)*

### **1. Ecosistemi aziendali: il contesto**

Ogni tecnologia applicata nella zootecnia di precisione (PLF) ha un potenziale valore intrinseco per ogni singolo allevamento, e quindi può essere valutata allo stesso modo di altri prodotti / servizi. Tuttavia, il massimo valore di ogni tecnologia PLF non si realizza utilizzando una sola tecnologia, applicata singolarmente. Sebbene le tecnologie stesse siano progettate, costruite e funzionino individualmente, il loro massimo valore verrà da un ecosistema integrato, di cui fanno parte le singole tecnologie: un ecosistema costituito da più tecnologie sintetizzate in un insieme coeso e interconnesso.

Sir Arthur Tansley, un botanico britannico, ha introdotto il termine “ecosistema” nel 1935 per descrivere quelle che ha definito “le unità di base della natura” - una comunità di organismi che interagiscono tra loro e con i loro ambienti reciproci. In un articolo della Harvard Business Review del 1993, James F. Moore, ricercatore presso l'Università di Harvard, adattò il modello di ecosistema biologico a un contesto aziendale, coniando il termine “ecosistema commerciale” e definendolo come:

*“Una comunità economica supportata da una base di organizzazioni e individui interagenti: gli organismi del mondo degli affari. La comunità economica produce beni e servizi di valore per i clienti, che sono essi stessi membri dell'ecosistema. Gli organismi membri includono anche fornitori, produttori, concorrenti e altre parti interessate. Nel corso del tempo, coevolvono le loro capacità e ruoli e tendono ad allinearsi con le indicazioni stabilite da una o più società centrali. Quelle aziende che ricoprono ruoli di leadership possono cambiare nel tempo, ma la funzione di leader dell'ecosistema è valutata dalla comunità, perché consente ai membri di spostarsi verso visioni condivise per allineare i loro investimenti e trovare ruoli reciprocamente sostenibili.”*

Nel 1996, Moore ha delineato la sua tesi sull'ecosistema aziendale e il suo impatto sulla struttura della catena del valore, in particolare l'importanza di una comunità interdipendente di partenariati collaborativi e un maggiore coinvolgimento dei clienti. All'interno degli spazi di mercato in cui operano gli ecosistemi aziendali, la natura dell'innovazione e la natura della concorrenza cambiano ed evolvono in modo profondo.

Indipendentemente dal fatto che siamo impegnati nell'agricoltura e nella produzione di colture / bestiame o meno, nella nostra vita personale e professionale abbiamo familiarità con alcuni ecosistemi aziendali come ad esempio Apple, Amazon, eBay, Facebook, Google, Intel, Microsoft, Netflix, Samsung, Uber e Wal-Mart. Coinvolgiamo questi ecosistemi ogni volta che prendiamo i nostri telefoni, accendiamo i nostri computer, ci sediamo davanti ai nostri televisori, entriamo nelle nostre case e usciamo dalle nostre porte. Questi ecosistemi aziendali sono stati creati e sono in continua evoluzione almeno negli ultimi due decenni. Più recentemente nell'ambito dell'agricoltura, un pioniere nella ricerca dell'agricoltura di

precisione e nello sviluppo di un ecosistema agroalimentare è il produttore di attrezzature agricole John Deere.

Al contrario, per l'allevamento c'è ora un numero crescente di tecnologie PLF e piattaforme digitali disponibili e molte altre in arrivo, ma non sono ancora emersi sostanziali ecosistemi PLF all'interno dei quali operino queste numerose tecnologie.

Questo aspetto sta per cambiare, dato che le attuali tecnologie PLF e le piattaforme digitali si collegano e si integrano, passando da semplici sistemi monolitici all'integrazione e alla formazione di un sistema di sistemi più complesso. È da questa "zuppa di sistemi primordiali" che assisteremo alla nascita dei primi ecosistemi PLF. Molte tecnologie PLF e un certo numero di ecosistemi PLF prenderanno vita - alcuni falliranno, altri diventeranno vitali ma rimarranno limitati nella loro portata, altri cresceranno e si espanderanno - tale è la natura di tutti gli ecosistemi all'interno di qualsiasi ambiente, siano essi biologico, meccanico, digitale o una combinazione di essi.

### ***1.1 Il "Nuovo Mondo" per la produzione di bestiame***

Esistono tre elementi principali in un quadro strategico per tutti gli ecosistemi che integrano e connettono i sistemi cibernetici all'interno di qualsiasi ambiente aziendale: tecnologia, processo e cultura. Per tutte le aziende e le operazioni commerciali che operano all'interno di ogni ambiente aziendale, le persone sono i driver, le tecnologie i veicoli e i processi le strade. Il quadro strategico per gli ecosistemi PLF nell'allevamento non è diverso: si applicano gli stessi tre elementi primari e il quadro strategico per tutti gli ecosistemi PLF che integrano e collegano le tecnologie PLF in un ambiente di allevamento.

#### ***1.1.1 Tecnologia***

Analizzare le tecnologie come veicoli: esistono molti tipi diversi di veicoli progettati e costruiti per svolgere diverse funzioni: alcuni sono più veloci di altri, alcuni sono più forti di altri, alcuni sono più costosi di altri, alcuni sono più sicuri di altri, alcuni sono costruiti meglio e sono più duraturi di altri ... ma tutti sono strumenti che hanno scopi particolari e utilizzi che sono in grado di supportare.

Quando consideriamo tutte le industrie zootecniche a livello globale, abbiamo bisogno di strumenti e metodi di gran lunga migliori (ovvero i veicoli) per consentire:

- processo decisionale agricolo locale più veloce e meglio informato per le operazioni aziendali
- un migliore processo decisionale aziendale globale per la gestione e la leadership aziendale
- condivisione di dati e informazioni multi-business più rapida e senza interruzioni per processi decisionali su scala industriale.

La tecnologia ha il potenziale per rendere questi veicoli migliori. La tecnologia è, in effetti, l'obiettivo virtuale attraverso il quale possiamo vedere cosa sta succedendo nel nostro ambiente operativo - fungendo contemporaneamente sia da microscopio che da telescopio, permettendoci di vedere più chiaramente i dettagli granulari e il quadro generale. La tecnologia è il mezzo con cui completiamo e contrastiamo le nostre capacità di osservazione: ciò che vediamo, ascoltiamo, tocchiamo, annusiamo, assaggiamo e percepiamo intuitivamente. La tecnologia svolge un ruolo di consiglio consultivo virtuale - guardando il nostro ambiente in modi diversi (più ampi, più profondi, più continui) di quanto possiamo percepire come individui e dandoci una prospettiva migliorata (o la conferma del nostro pensiero o un necessario controllo realistico) su cui basare decisioni e azioni sicure. Nel processo di sfruttamento di veicoli / strumenti tecnologici, i dati sono la materia prima, l'informazione è il prodotto, la conoscenza è la valuta e le decisioni sono il valore.

### 1.1.2 Processo

Per utilizzare efficacemente i nostri veicoli disponibili, dobbiamo disporre di un sistema di autostrade e strade navigabili. I processi sono il sistema autostradale / stradale su cui guidiamo la nostra tecnologia. Alcune strade sono migliori di altre - che si tratti di sentieri, strade sterrate, strade sterrate a bassa manutenzione, autostrade a due corsie o quattro corsie o sistemi interstatali ad alta manutenzione. Nel mondo degli affari, i processi hanno lo scopo fondamentale di guidare il personale verso la loro destinazione, definire quali tecnologie sono necessarie per arrivarci e fornire un percorso chiaro ed indicazioni efficienti lungo il percorso. I processi variano ampiamente in termini di qualità e chiarezza: alcuni sono rudimentali e difficili da seguire, altri possono essere seguiti ma in modo marginale, mentre altri sono ben segnalati e facilmente percorribili.

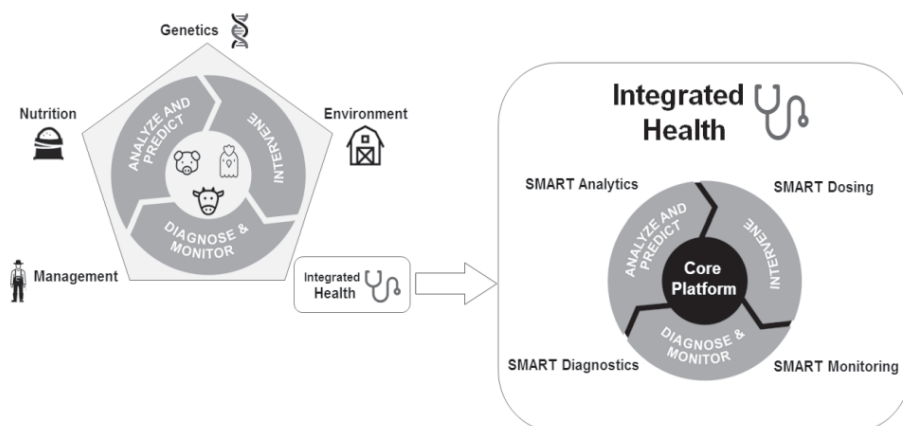
I processi all'interno degli ecosistemi aziendali forniscono sia la tabella di marcia - un modello, se così si può definire - con cui navigare, sia i punti di passaggio fisici e digitali, sia le destinazioni delle operazioni aziendali. I processi degli ecosistemi PLF nelle operazioni di allevamento non sono diversi: aggregati e interconnessi all'interno della struttura di un modello globale.

## 2. Ecosistemi PLF: un modello base

Un ecosistema PLF ampio e robusto sarà composto da cinque elementi fondamentali:

- Genetica (potenziale genetico intrinseco ed espressione fenotipica)
- Nutrizione (qualità dei nutrienti, formulazione e produzione della dieta)
- Ambiente (qualità dell'ambiente interno e influenza dell'ambiente esterno)
- Gestione (processi, protocolli e personale)
- Salute - Malattia (virulenza intrinseca e natura dell'esposizione)

Per le industrie di produzione di bestiame, questi cinque elementi coprono l'insieme di ciò che guida tutti i modelli operativi di produzione di prodotti vivi. Ogni elemento è indissolubilmente connesso e integrato con gli altri: la genetica influenza la risposta alla nutrizione, l'ambiente influenza l'espressione della genetica, la gestione influenza il livello di salute (impatto della malattia) e la malattia influenza i requisiti nutrizionali. Per essere completo e robusto in modo ottimale, un ecosistema PLF deve in definitiva comprendere tutti questi cinque elementi nella sua struttura e tenere conto della sintesi di ogni combinazione all'interno e tra ciascuna specie di bestiame (Figura 1).



**Figura 1:** I cinque elementi fondamentali di un ecosistema PLF per le operazioni in vivo di allevamento e la costruzione base di un sottosistema di salute integrata.

All'interno delle operazioni in vivo c'è un processo continuo di misurazione (diagnosi e monitoraggio), analisi (analisi e previsione) e intervento (prevenzione preventiva e trattamento contingente). Un solido ecosistema PLF incorporerà tecnologie in grado di misurare tutti i principali driver operativi, analizzare l'aggregazione ottimale delle misure, assicurare informazioni per una pronta decisione e fornire interventi efficaci.

### 3. Ecosistemi PLF: il ruolo della tecnologia

Un robusto ecosistema PLF deve essere composto da tecnologie che rientrano in sette categorie fondamentali, tutte connesse e interconnesse attraverso una piattaforma digitale di base (Figura 2).



**Figura 2:** Le sette categorie tecnologiche fondamentali dell'ecosistema PLF.

Tutte le tecnologie che compongono un ecosistema PLF hanno uno scopo fondamentale: supportare e ottimizzare il processo decisionale a tutti i livelli operativi – dipartimento, sito di allevamento, flusso, attività commerciale, regione e rete. È attraverso un processo decisionale migliorato (più veloce, più sicuro, meno costoso, più redditizio, più responsabile) che si ottengono risultati aziendali migliori e si può vivere meglio - decisioni migliori, affari migliori, vite migliori.

### 4. Verso la trasformazione del settore: la cultura necessaria

*“L'innovazione è difficile perché ‘risolvere i problemi che le persone non sapevano di avere’ e ‘costruire qualcosa di cui nessuno ha bisogno’ sembrano a prima vista la stessa cosa”. (Aaron Levie)*

Al di là dei bisogni strutturali, una sfida ancora più grande risiede nei cambiamenti comportamentali / culturali necessari per ottenere il massimo valore dalle tecnologie emergenti del PLF.

#### 4.1 Una nuova mentalità culturale del settore

Gli allevatori e i veterinari sono abituati a un modello di assimilazione di prodotti / servizi



in cui la ricerca e lo sviluppo, nonché i test di ipotesi vengono effettuati altrove, all'interno di scatole nere organizzative dei loro fornitori di prodotti e tecnologie. Vengono forniti loro prodotti / servizi o conoscenze preconfezionati per loro e già pronti per essere inseriti in una struttura operativa esistente. D'altra parte produttori e veterinari partecipano a prove e progetti sul campo per valutare nelle loro particolari condizioni le prestazioni dei nuovi e i nuovi prodotti / servizi, ma tutto ciò avviene comunque all'interno di una struttura operativa già definita e di un ambiente culturale in cui le capacità di questi nuovi prodotti / servizi sono già relativamente determinati dal fornitore.

Gli allevamenti sono molto meno (o per nulla) abituati a partecipare alle prime fasi di sviluppo delle tecnologie, ancor più per le tecnologie il cui valore non viene realizzato fino a quando non sarà adottata una rete geografica e operativa relativamente ampia. Uno dei cambiamenti nella mentalità comportamentale / culturale necessario per ottenere il valore più sostenibile dalle tecnologie PLF e un ecosistema PLF in cui opera è la trasformazione in una volontà (se non addirittura un entusiasmo) di coinvolgere le società PLF e le loro tecnologie di sviluppo molto prima, in fase di sviluppo.

#### **4.2 Una nuova mentalità culturale aziendale**

Il processo decisionale operativo aziendale è una combinazione dinamica e spesso inquieta di obiettività e soggettività, di dati e sentimenti, di scienza e intuizione. Il rapporto tra scienza e impresa è troppo spesso difficile, ma sta cambiando. È chiaro che una cultura scientifica di alta qualità può supportare un migliore processo decisionale attraverso lo sviluppo di metodi migliori di misurazione, sviluppando modi migliori di analisi e fornendo una maggiore fiducia nell'interpretazione. Tuttavia, affinché la scienza abbia più valore in un contesto di operazioni aziendali, dobbiamo ampliare la nostra visione dell'ambito scientifico.

Consideriamo due forme complementari di cultura scientifica: la scienza con radici istituzionali e la scienza su scala industriale. La scienza con radici istituzionali è la scienza che utilizza metodi classici di progettazione, acquisizione dei dati e analisi statistica. La scienza istituzionale ha e continua a dare un contributo molto prezioso alle sue circoscrizioni aziendali e professionali, ma ha anche dei limiti. La scienza istituzionale può dire alle imprese: cosa è successo (retrospettiva, osservativa) e cosa può accadere, dato un insieme di condizioni specifico e definito (sperimentale). Ma per le aziende che eseguono operazioni di produzione ogni minuto di ogni giorno, ciò non è abbastanza per essere più efficace e massimizzare un potenziale sostenibile a lungo termine.

Dobbiamo integrare la scienza istituzionale (statica) con la scienza industriale (dinamica) - la scienza che può dirci cosa succede, ogni volta che succede, quando succede, che ci aiuta a capire perché succede e cosa possiamo fare al riguardo. Abbiamo bisogno di scienze industriali che proiettino / prevedano ciò che è probabile che accada se continuiamo a operare nello stesso modo e ci aiutino a identificare dinamicamente cosa cambiare (in meglio) in ciò che stiamo facendo, e dirci cosa vale davvero per la nostra attività. Le tecnologie di allevamento di precisione, in particolare quando interconnesse e sintetizzate in una struttura ecosistemica, sono esattamente ciò che contribuirà a fornire il tipo di scienza industriale di cui le aziende e le intere industrie hanno bisogno e troveranno prezioso su una base sostenibile continua.

#### **5. Per concludere...**

*"Il futuro è già arrivato. Non è distribuito uniformemente". (William Gibson)*

Il potenziale delle tecnologie di precisione per l'allevamento è chiaro. Per continuare a

inseguire questo potenziale e andare oltre, molte aziende nuove e già esistenti entreranno nel mercato PLF per fornire tecnologie PLF agli allevatori. La sfida per tutte queste società sarà quella di offrire una proposta chiara e di valore per i produttori, fornendo tecnologie e integrandole in ecosistemi che consentano esperienze positive per tutti gli utenti, a un costo che consenta una redditività chiaramente migliorata per le aziende produttrici e consenta ai consumatori di accedere a una fornitura sostenibile di proteine di alta qualità a prezzi accessibili.

Anche il potenziale degli ecosistemi PLF è chiaro: basta guardare al successo degli ecosistemi aziendali che tutti noi viviamo ogni giorno della nostra vita personale e professionale. Il successo, ovviamente, non può essere giudicato a breve termine. Quando si tratta di ecosistemi aziendali, la sostenibilità equivale al successo e per essere sostenibile l'ecosistema di successo deve possedere tre caratteristiche fondamentali:

- Deve essere (relativamente) economico da implementare ed eseguire
- Deve essere semplice e facile per gli utenti
- Deve fornire valore costante a tutti i partecipanti.

Le stesse caratteristiche di sostenibilità si applicheranno a tutti gli ecosistemi PLF di successo.

Gli ecosistemi PLF e le loro tecnologie integrate hanno un enorme potenziale per rivoluzionare l'allevamento, la salute e il benessere. Affinché tale potenziale si realizzi, devono essere risolti sia gli attuali vincoli infrastrutturali sia quelli comportamentali / culturali. Come partecipanti attivi in vari aspetti della industria di allevamento, noi - ognuno di noi a tutti i livelli - siamo direttamente responsabili per soddisfare le esigenze proteiche di una popolazione globale in crescita. Per fare ciò dobbiamo abbracciare quella responsabilità e quelle innovazioni che ci aiuteranno ad assumerci tale responsabilità - e le tecnologie e gli ecosistemi PLF sono proprio quel tipo di innovazioni.

*"Non hai buone idee se non vuoi essere responsabile per loro." (Alan Perlis)*

## **BIBLIOGRAFIA**

Polson, D (2019) Precision Livestock Farming Ecosystems: A Synthesis of Technology, Process and Culture *IAHJ* 6:3

# **STRATEGIE DI ZOOTECNIA DI PRECISIONE PER L'ALLEVAMENTO SUINO. IL FUTURO DELL'ALLEVAMENTO È OGGI REALTÀ.**

DR. CARMEN ALONSO

*García-Mochales, DVM, PhD*

*Technical Services, Integrated Health Management, Boehringer Ingelheim Animal  
Health, Germany*

## **INTRODUZIONE**

Entro il 2050 la popolazione mondiale raggiungerà i 9,1 miliardi, il 34% in più rispetto ad oggi, e la maggior parte di questo aumento riguarderà i paesi in via di sviluppo (1). Inoltre, la tendenza all'urbanizzazione globale creerà uno squilibrio ancora maggiore tra le popolazioni urbane (70%, rispetto all'attuale 49%) e quelle rurali (30%) (2). Per sfamare questa popolazione più numerosa, urbanizzata e ricca, la produzione alimentare (produzioni annue di proteine e cereali) dovrà aumentare del 70% nelle aree rurali nei prossimi 30 anni. La pressione creata dalla popolazione mondiale sulla catena di approvvigionamento alimentare, insieme ai cambiamenti climatici e all'aumento della produzione di biocarburanti da prodotti agricoli, rappresentano un grave rischio per la sicurezza alimentare a lungo termine in tutto il mondo.

Ogni volta che ci riferiamo alla produzione di proteine animali come fonte alimentare per la popolazione globale, dobbiamo fare riferimento soprattutto alla produzione suinicola. Grazie al fatto che il suino è un animale onnivoro e adattabile ad ambienti e condizioni climatiche molto diversi, la produzione di carne suina e, quindi, il suo consumo superano quelli di tutte le altre carni. Senza dubbio, i suini svolgono un ruolo fondamentale nel fornire una fonte di proteina di alta qualità alla popolazione umana. Negli ultimi anni, i sistemi di produzione suinicola hanno continuato a registrare una maggiore efficienza in termini di produttività per capo. Dal punto di vista produttivo, il costo della carne suina è stato un fattore chiave per la sostenibilità dell'allevamento. Tuttavia, è noto che l'intensificazione degli allevamenti va di pari passo a una serie di preoccupazioni sociali legate alla sicurezza alimentare, alla sostenibilità ambientale, al benessere degli animali, nonché alla salute animale e umana (3). Se da una parte gli economisti ipotizzano che la produzione di carne dovrà aumentare e dovrebbe essere accessibile per una popolazione in crescita, dall'altra c'è l'aspettativa sociale che gli animali utilizzati per la produzione di carne debbano essere allevati "umanamente", considerando il benessere animale (4). Di conseguenza, solo gli allevatori altamente efficienti, che dimostrano rispetto per l'ambiente e pongono un'attenzione particolare alla salute umana, e alla salute e al benessere degli animali, potranno svolgere un ruolo chiave nella futura produzione suinicola. Chiaramente, è necessario sviluppare e implementare più strumenti tecnologici per una cosiddetta zootecnia di precisione (Precision Livestock Farming PLF), che forniscano le migliori opportunità per produrre in modo efficiente carne suina sostenibile dal punto di vista ambientale e del benessere animale, oltre a contribuire a un approvvigionamento di carne sana e conveniente, che possa rispondere alle richieste in materia di sicurezza alimentare.

## **Il contesto della produzione suinicola**

L'aumento dell'intensificazione e dell'efficienza produttiva dell'industria suinicola ha portato gli allevamenti ad utilizzare meno personale per gestire più animali, inoltre ci sono meno tecnici professionalmente formati disponibili per un settore in cui il benessere degli animali

e le pressioni per diminuire l'utilizzo di antibiotici sono diventati fattori chiave nei principali paesi di produzione. Di conseguenza, è necessario un più ampio utilizzo della tecnologia come strumento per monitorare grandi gruppi di animali e preservare in modo più efficace la loro salute e il loro benessere. La PLF implica il rilevamento e il monitoraggio da remoto e in modo automatizzato della salute e del benessere degli animali utilizzando un'analisi in tempo reale di diversi parametri come suoni, immagini, peso e altri parametri biologici (5,6). In uno studio condotto nel 2020 su 138 allevatori di suini negli Stati Uniti, l'85% riteneva di notevole importanza riuscire a monitorare la situazione sanitaria in allevamento. I risultati di questo sondaggio hanno anche evidenziato il tempo limitato che ha a disposizione l'allevatore per monitorare la salute, il benessere, l'alimentazione e l'ambiente, a causa dell'elevato numero di animali e di siti che devono supervisionare.

Appare quindi ovvia la necessità di strumenti tecnologici che aiutino gli allevatori a monitorare la salute, l'alimentazione e l'ambiente di allevamento. Tuttavia, gli allevatori sono disposti ad adottare e pagare tali strumenti per il loro lavoro quotidiano? Quando intervistati, hanno sottolineato ancora il fatto che avere persone fisiche anziché strumenti tecnologici è meglio perché "i problemi possono essere risolti immediatamente" e perché le cose possono essere viste e quindi gestite in modo diretto. D'altra parte, sono anche consapevoli della mancanza di personale qualificato e che il personale presente non può controllare gli animali durante tutto il giorno (e la notte) e che le persone fisiche sono associate ad un aumento dei rischi di biosicurezza. Durante la stessa indagine, quando è stata sondata la disponibilità a pagare per una soluzione tecnologica per la suinicoltura di precisione, la maggior parte degli allevatori intervistati ha indicato che sarebbe disposta a pagare per una soluzione in grado di monitorare la qualità della ventilazione o la temperatura in stalla. Entrambi questi tipi di tecnologie sono già ampiamente disponibili sul mercato. Tuttavia, quando è stato chiesto un parere riguardo una soluzione tecnologica di monitoraggio della salute dei suini, la maggior parte degli allevatori ha dato la preferenza ad una soluzione che potesse aiutarli a diminuire la mortalità nel periodo di svezzamento, ad esempio avvisando di una diminuzione dell'assunzione di mangime o dando un allarme in presenza di tosse individuale o a livello di box.

### **Limiti/sfide delle tecnologie PLF**

- Non tutte le tecnologie sviluppate o testate a livello di allevamento diventano prodotti fruibili in allevamento. La cooperazione tra ingegneri, ricercatori e altri attori dell'industria suinicola sarà fondamentale per identificare strumenti utili ed economici. Una conoscenza approfondita del settore sarebbe necessaria in ogni fase del processo (sviluppo, test e distribuzione) per identificare e risolvere problemi pratici di implementazione, come quelli derivati dalle condizioni ambientali dell'allevamento (ad esempio polvere, umidità, gas e mosche) e il comportamento esplorativo degli animali nei confronti di qualsiasi elemento alla loro portata.
- La presenza di elettricità e di un accesso alla rete internet stabili continuano ad essere limitati in alcune zone rurali.
- La capacità di ottimizzare la strumentazione in modo tale che diventi accessibile e disponibile per gli allevatori.
- Il valore individuale dell'animale è un fattore importante per giustificare il costo di determinate tecnologie. Gli animali più grandi (ad es. vacche da latte) o animali di produzione di alto valore (riproduttori) possono essere più facilmente dotati delle necessarie apparecchiature di monitoraggio rispetto a un singolo suino da macello.

### **Vantaggi delle tecnologie PLF**

- Le strumentazioni PLF possono contribuire a un monitoraggio coerente, obiettivo e regolare

degli animali in tempo reale. Questo tipo di dati di buona qualità offre immense possibilità per l'analisi e la creazione di modelli predittivi

- Forniscono maggiore trasparenza non solo all'allevatore, ma anche al macello, al rivenditore, ai produttori di mangimi e, in ultima analisi, al consumatore finale.

- Consentirebbero agli allevatori di risparmiare tempo e di utilizzare meglio il loro tempo per monitorare e gestire correttamente gli animali quando necessario.

- In definitiva, le tecnologie PLF, avendo il potenziale per migliorare la salute e il benessere degli animali, potrebbero anche contribuire a ridurre la necessità di farmaci come gli antibiotici (7).

### **I passaggi per creare il primo “ecosistema” PLF per l'allevamento suinicolo**

Non limitate alle soluzioni individuali, le attuali tecnologie PLF e le piattaforme digitali connettono e integrano le loro informazioni. Sono soluzioni individuali ma con l'obiettivo finale di integrare e formare un sistema di tecnologie più complesso. In generale, numerose soluzioni PLF falliranno, altre diventeranno praticabili ma non cresceranno e non persisteranno, mentre altre cresceranno e si espanderanno per diventare una soluzione sostenibile e pratica. Un ampio e robusto ecosistema PLF potrà monitorare e gestire i cinque elementi fondamentali della produzione zootecnica: genetica, nutrizione, ambiente, gestione e salute. Queste cinque componenti rappresentano tutti gli aspetti di interesse negli allevamenti zootecnici e nell'allevamento in generale. Un robusto ecosistema PLF incorporerà tecnologie in grado di MISURARE tutti i principali fattori operativi, ANALIZZARE l'insieme più ottimale di misure e FORNIRE informazioni utili a una decisione più rapida al fine di intervenire in modo efficace.

In questo scenario, Boehringer Ingelheim (BI), un'azienda con una lunga esperienza nella fornitura di soluzioni innovative volte a prevenire le malattie negli animali, si concentra su soluzioni PLF per la salute animale e SoundTalks e Farmera sono strumenti già pronti per essere commercializzati e resi disponibili agli allevatori. Farmera e SoundTalks sono soluzioni PLF che facilitano l'allevatore nel prendere decisioni in modo più rapido ed efficiente:

- SoundTalks: una tecnologia di monitoraggio continuo del suono che fornisce un'allerta precoce/ preallarme degli episodi di tosse elaborando file audio, utilizzando l'intelligenza artificiale e un algoritmo matematico. Il sistema di avviso automatizzato a LED (es. luci verdi, gialle, rosse), che viene calcolato dall'algoritmo utilizzando l'anamnesi e la variazione dell'indice di distress respiratorio (RDI) da uno specifico spazio, offre agli allevatori uno strumento per rilevare i focolai respiratori prima del personale. Di conseguenza, facilita la diagnosi e un intervento più precoce per ridurre al minimo l'impatto negativo complessivo sulla salute e sul benessere dei suini.

- Farmera: una piattaforma digitale che raccoglie e sfrutta i dati provenienti da diverse fonti relative alla produzione di suini per migliorare la salute e la produttività. Farmera registra gli eventi dell'allevamento come i movimenti degli animali, la mortalità, l'assunzione di mangime e i trattamenti (attraverso programmi specifici). Farmera rende l'inserimento dei dati il più semplice possibile utilizzando i dati dei sensori (tecnologia SoundTalks tra gli altri) e riducendo al minimo l'inserimento manuale dei dati.

### **CONCLUSIONI**

Si prevede che la popolazione mondiale raggiungerà i 9 miliardi di persone entro il 2050. Pratiche e tecnologie efficienti aiuteranno gli allevatori a soddisfare le esigenze della popolazione globale in modo da contribuire positivamente alla salute e al benessere di animali, persone e ambiente. Le tecnologie PLF sono una realtà nella moderna produzione di suini. Il continuo sviluppo di tali tecnologie con l'obiettivo di implementare il monitoraggio dei dati

su salute e benessere, nonché alimentazione e ambiente tra gli altri parametri, aumenterà le possibilità di consolidare una filiera virtuosa di produzione del suino, che offra trasparenza ai consumatori utilizzando un sistema di monitoraggio ventiquattro ore al giorno, sette giorni su sette.

Boehringer Ingelheim ha già sviluppato due efficaci strumenti PLF come parte del proprio “ecosistema” nell’allevamento suino. Queste tecnologie hanno lo scopo di supportare la produzione suinicola per favorire una crescita redditizia, un maggiore benessere degli animali, trasparenza per i consumatori e sostenibilità duratura, aiutando allo stesso tempo gli allevatori di suini ad abbracciare la digitalizzazione del settore.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. F.A.O. Livestock in a balance. Rome (2009)
2. F.A.O How to feed the world in 2050. Rome (2009)
3. De Boer, I.J.M. Innovation born of integration. Moving towards sustainable production of animal-source food. Inaugural lecture upon taking up the post of Professor of Animal Production Systems at Wageningen University, Wageningen, The Netherlands (2012)
4. Broom, D.M. Animal Welfare: An Aspect of Care, Sustainability, and Food Quality Required by the Public. *J. Vet. Med. Educ.* 2010, 37, 83–88.
5. Berckmans, D. Precision livestock farming technologies for welfare management in intensive livestock systems. *Rev. Sci. Tech.* 2014.
6. Norton, T. Review: Precision livestock farming: building ‘digital representations’ to bring the animals closer to the farmer. *Animal*. 2019. doi: 10.1017/S175173111900199X
7. Neethirajan, S. Recent advances in wearable sensors for animal health management, *Sens Biosensing Res.* 12 (2017) 15–29, <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2016.11.004>.



## GARANZIE SANITARIE DEL TRASPORTO. QUANTO POSSIAMO RITENERCI SICURI?

### ARE YOU CONFIDENT IN YOUR PIG TRANSPORT VEHICLE?

ROMAGOSA A.

*PIC Health Assurance*

#### INTRODUZIONE

Il trasporto di animali svolge un ruolo chiave nella trasmissione delle malattie nella produzione suinicola (1,4) a causa di diversi fattori:

- i camion sono “allevamenti su ruote” quando trasportano animali vivi
- anche senza animali all’interno, il camion può svolgere un ruolo nella trasmissione indiretta di agenti patogeni
- il camion può contaminarsi con nuovi microrganismi attraverso la contaminazione incrociata su strada, allevamenti, macelli o negli impianti di lavaggio dei camion
- il trasporto è gestito da persone e le persone commettono errori
- in UE esiste un numero enorme di movimenti di suini che non possiamo fermare. Un esempio: in Inghilterra, con una popolazione totale di 4,9 milioni di suini, circa 200.000 movimenti di animali all’anno vengono effettuati verso allevamenti, macelli o mercati del bestiame (2):

**Tabella 1:** numero di movimenti di suini nel Regno Unito all’anno

| Anno        | Verso allevamenti | Verso macelli | Verso mercati | Totale  |
|-------------|-------------------|---------------|---------------|---------|
| 2006        | 47560             | 143649        | 13907         | 205116  |
| 2007        | 43970             | 144922        | 11176         | 200068  |
| 2008        | 44576             | 147897        | 13469         | 205942  |
| 2009        | 48825             | 140580        | 14565         | 203970  |
| 2010        | 53360             | 146879        | 16950         | 217189  |
| 2011        | 36392             | 147066        | 14657         | 208115  |
| Totale      | 284683            | 870993        | 84724         | 1240400 |
| Percentuale | 23%               | 70%           | 7%            | 100%    |

Fonte: SRUC, 2014

#### Ridurre al minimo il rischio di trasmissione di malattie

Un aspetto chiave della biosicurezza dei trasporti sono le corrette pratiche di pulizia e disinfezione dei singoli veicoli, eseguite in modo adeguato a ridurre il rischio di contaminazione. Anche se sarebbe ideale avere tutti i veicoli di trasporto adeguatamente sterilizzati prima di ogni nuovo carico, questa pratica richiede tempo, denaro e strumenti giusti per farlo.

##### 1. Pulizia pre-lavaggio 1

Il primo passo è rimuovere la lettiera sporca e le feci. Questo passaggio può essere eseguito mediante “spazzata a secco” o “bassa pressione e alto volume di acqua”. Questo

passaggio è cruciale data l'alta concentrazione di microrganismi in questo materiale che può compromettere l'efficacia della successiva pulizia e disinfezione.

In questa fase gli strumenti utilizzati per caricare / scaricare gli animali (tuta, stivali, ecc.) e i tappetini di gomma dalla cabina o altri oggetti mobili devono essere rimossi dal camion per pulire e disinfettare tutti i punti. Inoltre, i rifiuti generati durante il trasporto (calzari, tute usa e getta, guanti, ecc.) devono essere eliminati.

## 2. Pulizia pre-lavaggio 2

Questo passaggio consente di rimuovere la sostanza organica meno incorporata. Dovrebbe essere effettuato con acqua a media pressione (30 bar) e acqua fredda o tiepida (tra 38 ° C e 46 ° C) (2) per evitare la diffusione di materia organica in altre parti del veicolo già pulite o nelle aree dell'impianto di lavaggio dei camion. Questo prelavaggio a umido viene effettuato prima all'interno del rimorchio e seguendo alcune linee guida: dall'alto verso il basso e dal basso verso la rampa di carico, che termina sull'esterno dell'intero veicolo (cassoni, cabina, ruote, telaio, ecc.).

## 3. Lavaggio

Lo scopo del lavaggio è rimuovere la sostanza organica dal camion che non è stato possibile eliminare nella fase precedente. Questo passaggio richiede l'uso di detergente. Il prodotto deve essere in grado di rimuovere il biofilm dalle superfici (biofilm: è una struttura collettiva di microrganismi che aderisce alle superfici e che è coperta da uno strato protettivo secreto dai microrganismi stessi). Il biofilm può mantenere i microrganismi attivi poiché li protegge dal contatto diretto con il detergente e il disinfettante.

Punti fondamentali perché un detergente sia un buon detergente:

- Efficacia su superfici non porose e metalliche
- Intervallo della temperatura operativa
- Efficacia su grassi, proteine e materia organica (detergente neutro o alcalino)
- Non corrosivo
- Attività antimicrobica

La diluizione dipenderà dalle raccomandazioni del produttore, ma può essere utilizzata acqua tiepida (non superiore a 40 ° C, può influire sull'attività del detergente). Il modo migliore di applicazione del detergente è attraverso una pistola per schiuma (non un tubo ad alta pressione). Ciò consentirà al detergente di aderire alle superfici e fornirà il tempo di contatto necessario per garantirne l'efficacia. La maggior parte delle volte, l'uso di un pennello nelle aree sporche del camion e negli angoli è molto utile per rimuovere la materia organica.

La procedura viene eseguita dall'interno del rimorchio e seguendo le stesse linee guida del prelavaggio. Il prossimo passo sarà l'esterno del veicolo: cabina, contenitori esterni, ruote e telaio. Il detersivo non deve essere lasciato asciugare, poiché ciò potrebbe ridurre l'efficacia del disinfettante utilizzato al termine del processo di C&D.

## 4. Risciacquo

Questo passaggio elimina la sostanza organica più incorporata. È importante utilizzare acqua calda (45 ° C -70 ° C). Temperature più elevate non sono correlate a una migliore efficienza e si può creare nebbia che non consente all'operatore di vedere correttamente.

Dovrebbe essere fatto con acqua ad alta pressione (max. 250 bar) a partire dall'esterno del camion (cabina, contenitori esterni, ruote, ecc.) e terminando all'interno del rimorchio, dall'alto verso il basso e dal basso verso la rampa di carico. Il risciacquo dovrebbe eliminare i residui di detergente che potrebbero inattivare i disinfettanti utilizzati nella fase successiva. Prima di spostare il veicolo in disinfezione, è importante eseguire un'ispezione visiva.

## 5. Disinfezione

A questo punto della procedura, il camion appare pulito, ma esiste ancora un livello residuo di microrganismi sul camion, che devono essere eliminati mediante il processo di disinfezione.

**Tabella 2:** carica microbica dopo i vari processi

| Livello di pulizia               | Batteri vitali/cm <sup>2</sup> |
|----------------------------------|--------------------------------|
| Prima della pulizia              | 50.000.000                     |
| Pulizia con acqua fredda         | 20.000.000                     |
| Pulizia con acqua calda e sapone | 100.000                        |

Fonte: Gadd, 1999

Il processo di disinfezione deve essere eseguito in un'area "pulita" dell'impianto di lavaggio camion, separata dall'area di pulizia (considerata area "sporca") per evitare la contaminazione incrociata.

La disinfezione è efficace solo se il microrganismo è in contatto diretto con l'agente biocida. Questo è il motivo per cui l'efficacia dei passaggi precedenti è fondamentale. Idealmente, la disinfezione dovrebbe essere eseguita dopo che il camion è stato asciugato, ma negli impianti di lavaggio camion non è frequente avere questa possibilità. Per questo motivo, si raccomanda che dopo la pulizia e prima della disinfezione il camion possa essere messo in una rampa per consentire il drenaggio dell'acqua, riducendo l'umidità sulle superfici.

L'agente biocida o il disinfettante possono essere applicati con una pistola per schiuma e iniziando dall'esterno del veicolo (compresi cabina, ruote, telaio e box) e terminando all'interno del rimorchio (dall'alto verso il basso e dal basso verso la rampa di carico). È importante che il tempo di contatto tra il disinfettante e le superfici segua le specifiche del produttore.

In questo momento, devono essere eseguiti anche i C&D degli interni della cabina. È un punto critico perché se il conducente non segue le corrette misure di biosicurezza nel carico / scarico degli animali negli allevamenti o nei macelli, probabilmente le portiere, i pedali, il volante, ecc., saranno contaminati. Salviette o spray con disinfettante sono disponibili sul mercato per eseguire questa procedura.

Di solito questo è il passaggio finale delle attuali procedure di C&D. Il processo totale può richiedere fino a 2-3 ore.

### **Utilizzo di nuove tecnologie per il trasporto suino**

#### 1. Come migliorare il processo C&D del camion?

Una bassa temperatura, 4 ° C o 6 ° C e un'elevata umidità (ad es. > 70%) sono state associate a una più lunga persistenza per la maggior parte di batteri, funghi e virus (1). La procedura di essiccazione superficiale è scientificamente riconosciuta e ha dimostrato di "aiutare" nella decontaminazione di molti patogeni suini come PRRSV (3,4), PEDV (5), *E. coli* (6), Salmonella (7), Dissenteria suina (8) e PSC (9). Dal 2004, il trattamento termico dei camion è stato utilizzato come sistema di decontaminazione automatica in alcuni paesi (Stati Uniti, Canada, Messico o Brasile). Questo sistema di essiccazione è chiamato TADD (Thermo-Assisted Drying Decontamination System®) ed è stato sviluppato da PIC US. Il principio del TADD è di aumentare la temperatura superficiale dei rimorchi fino a 71 ° C per 30 minuti (3) o meno (5) a seconda del patogeno bersaglio, per favorire l'essiccazione e il degrado del microrganismo.

Nella tabella seguente, sono riportati alcuni esempi di temperature e tempo di inattivazione di alcuni dei patogeni suini più importanti sulle superfici metalliche o nella materia organica:

| Patogeno      | Temperatura | Tempo  | Rif. Bibliografico     |
|---------------|-------------|--------|------------------------|
| PRRSV         | 71°C        | 30 min | Dee et al, 2005        |
| PRRSV         | 71°C        | 20 min | Dee et al, 2005        |
| PEDV          | 71°C        | 10 min | Thomas et al, 2015     |
| ASF           | 60°C        | 20 min | Mebus et al, 1998      |
| ASF           | 60° C       | 15 min | Turner et al, 1999     |
| CSF (culture) | 60°C        | 10 min | Rajbongshi et al, 2011 |

**Figura1:** Sistema Bio-dry (TADD)



Utilizzando lo stesso principio, esiste anche un sistema di termodecontaminazione automatico, Dry-syst®, sviluppato nell'UE ma con alcune differenze rispetto al TADD. In questo caso, si ottiene un risparmio energetico spostando la parete di emissione calore lungo ogni lato del rimorchio e formando un punto di presa dietro la cabina. Questo concentra il calore che viene fornito da un generatore di calore spostato in posizione e diretto nella parte posteriore del vano rimorchio. Inoltre, il controllo della temperatura viene effettuato utilizzando una termocamera che misura la temperatura della superficie metallica anziché dell'aria (utilizzando sensori tradizionali).

**Figura 2:** Controllo della temperatura della superficie del rimorchio mediante una termocamera



Entrambi i sistemi forniscono al conducente e / o all'azienda un report automatico e la tracciabilità del processo. Questo report può anche essere ricevuto dal cliente prima del carico degli animali.

### 2. Come facilitare l'ispezione e la validazione del processo di C&D?

Il sistema tradizionale si basa su ispezione visiva, test microbiologico e misuratore di ATP. Si consiglia di eseguire un'ispezione visiva dopo il processo di pulizia e prima della disinfezione poiché la materia organica può compromettere il processo di disinfezione chimica o del riscaldamento.

Per quanto riguarda l'uso delle telecamere per rilevare la materia organica in un camion è un sistema innovativo che potrebbe sostituire in futuro l'ispezione visiva, in grado di fornire un metodo oggettivo per valutare il processo del processo di C&D (10). Le telecamere intelligenti possono essere addestrate per rilevare tracce di materia organica nel camion. L'hardware e il software esistono già e sono ampiamente utilizzati nell'industria alimentare e farmaceutica.

### 3. Come monitorare la sicurezza dei tuoi animali durante il trasporto?

Per il monitoraggio della sicurezza degli animali durante il trasporto è necessario un sistema automatico dedicato specificamente al monitoraggio in tempo reale. Oltre alle funzioni di base incluse nei normali sistemi di monitoraggio del camion, i sensori montati all'interno del camion consentiranno di monitorare il benessere degli animali, un relativo modulo di report del registro di viaggio genererà i report di trasporto necessari in modo più rapido e semplice.

Le funzionalità di base di tali sistemi automatici è il risultato dei requisiti di trasporto di animali europei e nazionali che il sistema deve soddisfare. Questi requisiti sono stati specificati direttamente nei documenti legali:

- Monitoraggio della posizione del veicolo
- Monitoraggio della temperatura attuale del compartimento degli animali
- Monitoraggio dello stato del portellone posteriore del veicolo
- Avviso automatico in caso di eventi definiti come pericolosi / indesiderati
- Accesso ai dati storici
- Generazione di rapporti su parametri quali distanza percorsa, tempo di viaggio, temperatura, ecc. (Registri di viaggio).

Tuttavia, le esigenze degli utenti (società di trasporto di bestiame) possono essere adattate a questo sistema di base per aumentare la qualità del servizio e offrire una tracciabilità del nostro trasporto. Alcuni esempi delle possibilità esistenti:

- Interfaccia utente nella cabina del conducente del camion - un'applicazione per tablet o smartphone - per visualizzare le informazioni direttamente al conducente e / o per controllare il sistema da remoto durante il viaggio
- L'integrazione con il tachigrafo digitale consente di verificare se i dati di navigazione sono conformi ai dati del tachigrafo
- Identificazione elettronica degli animali mediante un sistema basato su tag RFID: capacità di monitorare il numero di animali nel veicolo
- Guida eco: monitoraggio dello stile di guida
- Monitoraggio del livello dell'acqua potabile per gli animali
- Lettura dei dati dal modulo CAN-bus (ad es. Monitoraggio del peso del carico, consumo di carburante)

## BIBLIOGRAFIA:

1. POUMUNIAN, A.M. (1995) “Disinfection of trucks and trailers”. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 1995,14 (1), 171-176
2. SRUC Final report (2014) “Combined spatial and network analysis of Great Britain pig movement and abattoir surveillance data”. Edimburg,UK. <https://pork.ahdb.org.uk/media/72736/combined-spatial-and-network-analysis-of-great-britain-movement-and-abattoir-surveillance-by-diogo-marques-final-report.pdf>
3. DEE S.A. (2005).” *An evaluation of the Thermo-Assisted Drying and Decontamination (TADD) system for the elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from contaminated livestock transport vehicles*”. Can Vet J Res. 2005;69:58–63. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15745224>
4. DEE S.A, (2004). “*An experimental model to evaluate the role of transport vehicles as a source of transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to susceptible pigs*”. Can J Vet Res. 2004;68:128–133. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1142156/>
5. THOMAS P.R, (2014). “*Evaluation of time and temperature sufficient to inactivate Porcine Epidemic Diarrhea virus in swine feces on metal surfaces*”. AASV, Oct. 21. <https://www.aasv.org/shap/issues/v23n2/v23n2p84.pdf>
6. BILLI D. (2000). “*Engineering Desiccation tolerance in Escherichia coli*”. Appl Environ Microbiol. 2000 Apr; 66(4): 1680–1684. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC92041/>
7. JIN T. (2008).” Thermal resistance of Salmonella enteritidis and Escherichia coli K12 in liquid egg determined by thermal-death-time disks”. Journal of food Engineering. Vol 8, Feb, 2008, 608 [https://www.researchgate.net/publication/222824674\\_Thermal\\_resistance\\_of\\_Salmonella\\_Enteritidis\\_and\\_Escherichia\\_coli\\_K12\\_in\\_liquid\\_egg\\_determined\\_by\\_thermal-death-time\\_disks](https://www.researchgate.net/publication/222824674_Thermal_resistance_of_Salmonella_Enteritidis_and_Escherichia_coli_K12_in_liquid_egg_determined_by_thermal-death-time_disks)
8. ALVAREZ-ORDOÑEZ A. (2013). “*Swine Dysentery: Aetiology, Pathogenicity, Determinants of Transmission and Fight against Disease*”. Int J Environ Res Public Health. 2013 May; 10(5): 1927–1947. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709357/>
9. ROVID-SPICKLER A. (2007). “*CSF Inactivation in Meat*”. Center for Food Safety and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University. Feb. 2007. <http://www.cfsph.iastate.edu/pdf/classical-swine-fever-csf-inactivation-in-meat>
10. MEHL P.M. (2004). “Development of hyperspectral imaging technique for the detection of apple Surface defects and contamination. Journal of Food Engineering, 61, 67-81.



# **COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE**



# IL TRASPORTO AL MACELLO AUMENTA LA CARICA DI *SALMONELLA* NELLE FECI E MODIFICA IL MICROBIOTA DEI SUINI DA INGRASSO

## TRANSPORT TO THE SLAUGHTERHOUSE AFFECTS THE LOAD OF *SALMONELLA* IN FAECES AND MODIFIES THE MICROBIOTA OF FINISHING PIGS

MASSACCI F.R.<sup>1,2,3,\*</sup>, MORELLI A.<sup>1,\*</sup>, CUCCO L.<sup>1</sup>, ZICAVO A.<sup>1</sup>, TOFANI S.<sup>1,4</sup>,  
PEZZOTTI G.<sup>1</sup>, ESTELLÉ J.<sup>3</sup>, PANICCIÀ M.<sup>1</sup>, MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy

<sup>2</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>3</sup>GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

<sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana 'M. Aleandri', Roma, Italy

\*Questi autori hanno contribuito in egual modo al lavoro

**Parole chiave:** suino; infezione; *Salmonella*; microbiota intestinale

**Keywords:** swine; infection; *Salmonella*; gut microbiota

### RIASSUNTO

La carne di maiale costituisce una fonte rilevante di *Salmonella* per l'uomo. La contaminazione delle carcasse si realizza al macello a partire dal contenuto intestinale ed è dipendente dalla carica di *Salmonella* in questa sede. La prevalenza di suini positivi per *Salmonella* aumenta significativamente quando il tempo del trasporto al macello è superiore alle 2 ore. L'ipotesi alla base di questo studio è che il trasporto al macello aumenti la carica di *Salmonella* nelle feci e determini una modificazione del microbiota fecale nei suini da ingrasso. Questo studio è stato condotto in un allevamento di suini positivi per *Salmonella* spp. in Italia centrale. I campioni di feci sono stati raccolti il giorno prima del trasporto e al macello dagli stessi animali. La carica di *Salmonella* nei campioni fecali è stata valutata con la tecnica del *most probable number* (MPN), secondo il protocollo ISO / TS 6579-2: 2012 / A1 (2012). Inoltre, la composizione batterica fecale è stata valutata sequenziando il gene 16S mediante tecnologia Illumina. Lo studio ha dimostrato che la carica di *Salmonella* aumenta dopo il trasporto (test di Wilcoxon sign rank test;  $p = 0,013$ ), confermando che questa fase della catena di produzione è un punto critico per il controllo della contaminazione del patogeno. Una ricchezza microbica inferiore e una più elevata eterogeneità nel gruppo hanno caratterizzato il microbiota fecale degli animali positivi a *Salmonella*. Questo risultato è in accordo con studi già presenti in letteratura. Inoltre, in questa ultima fase di produzione, un'infezione naturale da *Salmonella* provoca una profonda modificazione del microbiota fecale simile a quella osservata nelle infezioni sperimentali.

### ABSTRACT

Contaminated pork is a significant source of foodborne Salmonellosis. Pork is contaminated at the slaughterhouse and the intestinal content is predominant source of *Salmonella* for carcass contamination. The prevalence of *Salmonella*-positive pigs increases significantly when the time of transport to the slaughterhouse is longer than 2 hours. The hypothesis behind this study is that transport to the slaughterhouse increases the load of *Salmonella* in faeces and determines a shift of the faecal microbiota in finishing pigs. This study was carried out in a pig herd positive for *Salmonella* spp. in the Central Italy. Faecal samples were collected the day before the transport

and at arrival at the slaughterhouse from the same pigs. *Salmonella* loads in faecal samples were estimated by the most probable number (MPN) technique, according to the ISO/TS 6579-2:2012/A1 (2012) protocol. Moreover, the faecal bacteria composition was assessed by high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene. Our study showed that the load of *Salmonella* increases after transport (Wilcoxon sign rank test;  $p=0.013$ ), confirming that this phase of the production chain is a critical point for the control of *Salmonella* contamination. A lower richness and an increased heterogeneity within the group characterized the faecal microbiota of *Salmonella* positive animals, in accordance to the literature. In this stage, a natural *Salmonella* infection causes a disruption of the fecal microbiota that is similar to the one observed in challenge studies.

## INTRODUZIONE

La salmonellosi è una delle più importanti malattie di origine alimentare in UE (EFSA, 2019). Nel 2018 sono stati segnalati e confermati 91857 casi di salmonellosi nell'uomo e la carne di maiale è riconosciuta come una delle principali fonti (EFSA, 2019). *Salmonella* può infettare i suini in allevamento, nei mezzi di trasporto, nelle stalle di sosta ed infine può contaminare le carni durante il processo di macellazione. Il trasporto degli animali dall'allevamento al macello svolge un ruolo importante nella trasmissione di *Salmonella*, con conseguente aumento del rischio di contaminazione delle carcasse (Arguello *et al.*, 2013). La prevalenza dei suini positivi a *Salmonella* aumenta quando il tempo di trasporto al macello è  $>2$  ore (Zou *et al.*, 2017). Secondo Berends *et al.*, (1997) un tempo di trasporto di 2-6 ore, insieme al ricovero in stalle da sosta potrebbero raddoppiare il numero di suini portatori di *Salmonella*. Inoltre, l'infezione da *Salmonella* può essere acquisita durante il trasporto attraverso il contatto con camion o pavimenti nelle stalle di sosta contaminati (Magistrali *et al.*, 2008). Durante la macellazione, il contenuto intestinale e le feci dei suini portatori sono fonte principale di *Salmonella* per la contaminazione della carcassa (Van Hoek *et al.*, 2012). In un precedente studio, abbiamo dimostrato che il rischio di contaminazione della carcassa è maggiore quando la carica intestinale di *Salmonella* nei suini al macello è  $\geq 103$  CFU/g (Pesciaroli *et al.*, 2017).

Studi presenti in letteratura hanno descritto una modificazione del microbiota intestinale suino come conseguenza dell'infezione da *Salmonella* (Argüello *et al.*, 2018; Bearson *et al.*, 2013; Drumo *et al.*, 2016). Tuttavia, la maggior parte di queste indagini è stata condotta in studi sperimentali che potrebbero non riflettere le condizioni che si verificano durante un'infezione naturale da *Salmonella*. Inoltre, non sono disponibili dati sulla modifica del microbiota fecale dopo il trasporto al macello, che rappresenta un punto di controllo critico per la contaminazione da *Salmonella* nella catena di produzione della carne suina.

L'ipotesi alla base di questo studio è che un trasporto di più di due ore al macello aumenti la carica di *Salmonella* nelle feci e determini una modificazione del microbiota fecale nei suini da ingrasso.

## MATERIALI E METODI

### Disegno animale

Questo studio ha coinvolto 50 maiali da ingrasso provenienti da un'azienda positiva per *Salmonella* situata in Italia centrale. Il tempo di trasporto al macello è stato di circa sei ore. Le feci sono state raccolte in allevamento il giorno prima del trasporto e al macello. I campioni sono stati conservati a  $+4^{\circ}\text{C}$  e processati entro le 12 ore. Le aliquote per lo studio del microbiota intestinale sono state congelate in azoto liquido e poi conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

### Esame colturale

La ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata attraverso una tecnica miniaturizzata secondo la norma ISO/TS6579-2:2012/A1, che fornisce un metodo per la numerazione di *Salmonella* spp. mediante calcolo del *most probable number* (MPN) (Anonymous, 2012). Le colonie tipiche sono state confermate biochimicamente (Api Rapid 20E, bioMérieux) e sierologicamente

(*Salmonella* test sera omnivalent/polyvalent, Siemens). Il calcolo del MPN è stato calcolato utilizzando il calcolatore MPN, disponibile sul online <http://standard.iso.org/iso/ts/6579/-2>. La caratterizzazione sierologica dei ceppi di *Salmonella* spp. (*Salmonella* sera Statens Serum Institut) è stata eseguita secondo lo schema di White-Kauffman-Le Minor (WHO, 2007).

#### *Estrazione del DNA e sequenziamento del gene 16S rRNA*

Per l'estrazione del DNA da materiale fecale è stato utilizzato il Qiagen QIAamp DNA stool kit (Dore *et al.*, 2015). Il profilo microbico è stato ottenuto sequenziando le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando lo strumento MiSeq Illumina e seguendo le specifiche del protocollo Illumina, avvalendosi dei seguenti oligonucleotidi: PCR1F\_343 (5'-CTTTCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG-3') e PCR1R\_784 (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3'). Le reads generate nel formato FastQ, sono state valutate qualitativamente con il FastQC software e successivamente analizzate utilizzando la pipeline QIIME v1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), seguendo la strategia di *open-reference sub-sampled* OTU calling utilizzando il classificatore GreenGenes (Rideout *et al.*, 2014) e creando le *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Le OTU con un numero inferiore allo 0,005% del numero totale di sequenze sono state rimosse dal dataset (Bokulich *et al.*, 2012). Le sequenze chimeriche sono state rimosse ed i campioni con meno di 10000 reads sono stati eliminati dalla successiva analisi statistica.

#### *Analisi statistiche*

L'elaborazione è stata effettuata tramite programma R (v. 3.6.1) (TeamCore, 2018). È stata utilizzato come soglia di significatività  $p < 0.05$ . Sono state confrontate le percentuali di campioni fecali positive in allevamento e al macello mediante test  $\chi^2$  di Mc Nemar. Le cariche di *Salmonella* spp. in feci prelevate in allevamento e al mattatoio sono state analizzate tramite test di Wilcoxon per dati appaiati.

Per l'analisi del microbiota fecale, la nostra ipotesi è stata suddivisa in 3 diverse domande:

i) Lo stato di *Salmonella* è associato ad una diversa composizione di microbiota intestinale nei suini al macello? Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti nel macello, da animali negativi per *Salmonella* (N = 20) e da suini positivi a *Salmonella* (N = 13) (Test 1);

ii) L'infezione da *Salmonella* durante il trasporto influenza il microbiota fecale dei suini? Abbiamo incluso gli animali che sono diventati positivi a *Salmonella* dopo il trasporto. Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti dallo stesso animale in allevamento e al macello (N = 11) (Test 2);

iii) Il trasporto al macello influisce sul microbiota intestinale dei suini? In questo gruppo abbiamo incluso solo animali negativi alla *Salmonella*. Abbiamo confrontato campioni fecali raccolti dallo stesso maiale in allevamento ed al macello, (N = 16) (Test 3);

Brevemente, la tabella delle OTU è stata importata in R con il pacchetto Phyloseq (v.1.28) (McMurdie and Holmes, 2013) genetics, phylogenetics, multivariate statistics, visualization and testing. With the increased breadth of experimental designs now being pursued, project-specific statistical analyses are often needed, and these analyses are often difficult (or impossible). Utilizzando il pacchetto Vegan v2.5-6 (Oksanen, 2015) la diversità  $\alpha$ ,  $\beta$  e la ricchezza della composizione del microbiota sono state calcolate a livello di OTU. La diversità  $\alpha$  è stata calcolata utilizzando l'indice di Shannon e la diversità  $\beta$  tramite l'indice di Whittaker. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata calcolata, insieme al Tukey Honest Significant Differences per le diversità  $\alpha$  e  $\beta$ . La distanza Bray-Curtis è stata utilizzata per l'analisi del *Non-Metric Multidimensional Scaling* (NMDS). Inoltre le ipotesi nulle di nessuna differenza all'interno dei gruppi sono state testate tramite la funzione "envfit" e la funzione "adonis" per l'analisi

multivariata, usando per entrambi i test la distanza di Bray-Curtis. L'analisi differenziale è stata effettuata a livello di OTU utilizzando il pacchetto metagenomeSeq e la funzione "fitZig" (Paulson *et al.*, 2013).

## RISULTATI

### Esame colturale

La percentuale di suini positivi per la *Salmonella* non è variata dopo il trasporto: cinque suini su 49 (10,2%, IC95%: 3,8% -23%) erano positivi per *Salmonella* spp. in allevamento, mentre 13/49 (26,5% IC95%: 15% -41,3%) al macello (test  $\chi^2$  di Mc Nemar;  $p=0,12$ ). Complessivamente, ventotto suini (57,1% IC95%: 42,3% -70,9%) sono risultati positivi per la *Salmonella* in almeno un'occasione di campionamento. I sierotipi rilevati sia in allevamento che nel macello erano *Salmonella* Rissen e la variante monofasica di *Salmonella* Typhimurium (4.12: i :-). La carica batterica nelle feci variava da 2 log<sub>10</sub> MPN/g, a 6 log<sub>10</sub> MPN/g, che era il limite di rilevazione superiore del test. La carica di *Salmonella* nei campioni fecali è aumentata dopo il trasporto (Wilcoxon test;  $p=0,013$ ). I risultati della cultura microbiologica sono mostrati nella tabella 1.

**Tabella 1.** Campioni fecali risultati positivi a *Salmonella* all'esame colturale collezionati in allevamento ed al macello. Sono indicati i valori di MPN/g ed il relativo sierotipo identificato.

**Table 1.** Animals resulted positive for *Salmonella* on the microbiological culture test carried out on the faecal samples collected on farm and at the slaughterhouse. The MPN/g and relative serotype identified are indicated.

| ID | Allevamento |       |             | Macello |          |             |
|----|-------------|-------|-------------|---------|----------|-------------|
|    | Feci        | MPN/g | Sierotipi   | Feci    | MPN/g    | Sierotipi   |
| 2  | N           | 0     |             | P       | 32       | S. Rissen   |
| 12 | N           | 0     |             | P       | 78       | S. 4,12:i:- |
| 19 | N           | 0     |             | P       | 77       | S. 4,12:i:- |
| 21 | N           | 0     |             | P       | 74       | S. 4,12:i:- |
| 22 | P           | 6     | S. Rissen   | N       | 0        |             |
| 23 | N           | 0     |             | P       | 5900     | S. Rissen   |
| 25 | P           | 32    | S. Rissen   | P       | 4000     | S. 4,12:i:- |
| 26 | N           | 0     |             | P       | 120      | S. 4,12:i:- |
| 28 | N           | 0     |             | P       | 51       | S. 4,12:i:- |
| 36 | N           | 0     |             | P       | 33       | S. Rissen   |
| 44 | P           | 100   | S. Rissen   | N       | 0        |             |
| 46 | P           | 3100  | S. 4,12:i:- | P       | 25000000 | S. 4,12:i:- |
| 47 | P           | 420   | S. 4,12:i:- | N       | 0        |             |
| 48 | N           | 0     |             | P       | 160      | S. 4,12:i:- |
| 55 | N           | 0     |             | P       | 84       | S. 4,12:i:- |
| 57 | N           | 0     |             | P       | 1100     | S. 4,12:i:- |

N=negativo; P=positivo

### Sequenziamento del microbiota fecale, identificazione e annotazione OTU

Dopo il controllo di qualità, una media di 19530,51 (S.D. = 4010,74) era disponibile per ogni campione. Le sequenze sono state raggruppate in 1237 OTU e solo l'1,29% delle OTU non è stato assegnato a un determinato phylum. I phyla *Firmicutes* (854/1237) e *Bacteroidetes* (248/1237) rappresentavano rispettivamente il 69% e il 20% delle OTU totali. All'interno del



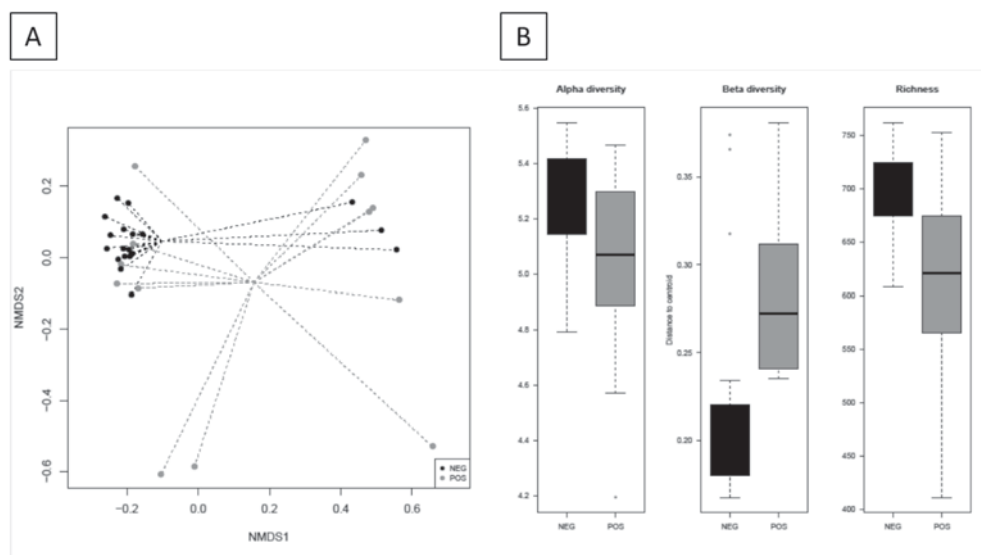
phylum *Firmicutes*, il 96% (823/854) delle OTU è stato assegnato all'ordine *Clostridiales*, il 46% (379/823) alla famiglia *Ruminococcaceae* e il 20% (161/823) alla famiglia *Lachnospiraceae*. All'interno del phylum *Bacteroidetes*, il 43% (107/248) è stato assegnato al genere *Prevotella*.

#### Composizione del microbiota fecale

Nel test 1, la composizione del microbiota fecale al macello era diversa tra animali negativi e positivi ( $p=0,02$ ). La diversità  $\beta$  era diversa in base allo stato di *Salmonella* nei suini ( $p=0,028$ ), mostrando eterogeneità tra i campioni negli animali positivi a *Salmonella*. Nel plot NMDS, i centroidi dei due gruppi apparivano separati in modo significativo ( $p=0,001$ ; Figura 1). La diversità  $\alpha$  e la ricchezza microbica osservata a livello di OTU hanno anche mostrato differenze tra gli animali *Salmonella* positivi e *Salmonella* negativi ( $p=0,02$ ;  $p=0,001$ , rispettivamente). Gli animali positivi a *Salmonella* hanno mostrato una diversità  $\alpha$  e ricchezza inferiori rispetto agli animali negativi. Lo stato di *Salmonella* nei suini è stato utilizzato nel modello dell'analisi differenziale a livello di OTU, descrivendo 12 OTU differentemente abbondanti (DA) al macello. I suini positivi a *Salmonella* avevano OTU DA appartenenti principalmente ai generi *Prevotella*, *Parabacteroides* e *Butyrivimonas* rispetto ai suini negativi per *Salmonella*.

**Figura 1.** La figura include campioni fecali collezionati al macello, da animali negativi per *Salmonella* (N=20) e da suini positivi a *Salmonella* (N=13) (Test 1). **(A)** NMDS che rappresenta le differenze nella composizione del microbiota fecale degli animali. **(B)** Boxplots rappresentanti la diversità  $\alpha$  (indice di Shannon), la diversità  $\beta$  (indice di Whittaker) e la ricchezza (numero totale di OTU presenti in ciascun campione) a livello di OTU. I campioni sono colorati in base allo status di *Salmonella*: NEG (animali negativi, nero) e POS (animali positivi; rosso).

**Figure 1.** Figure includes faecal samples collected at the slaughterhouse, from *Salmonella* negative animals (N=20) and from *Salmonella* positive pigs (N=13) (Test 1). **(A).** Dissimilarities in faecal microbiota composition represented by the non-metric multidimensional scaling (NMDS) ordination plot, with Bray-Curtis dissimilarity index calculated on unscaled OTU abundances. **(B)** Box plot graph representation of the  $\alpha$  diversity (Shannon index),  $\beta$  diversity (Whittaker's index) and richness (total number of OTUs present in each sample) using the rarefied OTU table. Samples are colored by status of *Salmonella*: NEG (negative animals, black) and POS (positive animals; red).



Nel test 2, il microbiota fecale è stato influenzato dallo stato di *Salmonella* ( $p=0,00001$ ). La diversità  $\beta$  differiva tra gli animali ( $p=0,001$ ). Nel plot NMDS, i centroidi dei due gruppi sperimentali apparivano separati, risultando in un valore significativo ( $p=0,0001$ ). La diversità  $\alpha$  a livello di OTU e la ricchezza microbica osservata non differivano tra gli animali negativi e positivi ( $p>0,05$ ). Le analisi differenziali hanno mostrato 326 OTU DA. Complessivamente, *Prevotella*, *Coprococcus* e *Parabacteroides* erano più abbondanti negli animali positivi, mentre il *Ruminococcus* in quelli negativi.

Nel test 3, la composizione del microbiota fecale non è stata influenzata dal trasporto ( $p>0,05$ ). La diversità  $\beta$  differiva tra i campioni fecali campionati in allevamento ed al macello ( $p=0,005$ ). Nel plot NMDS, i centroidi dei campioni raccolti in allevamento e al macello apparivano separati, risultando in un valore significativo (test di envfit;  $p=0,04$ ). La diversità  $\alpha$  a livello di OTU non differiva ( $p>0,05$ ) mentre la ricchezza microbica osservata mostrava differenze tra i gruppi ( $p=0,004$ ). Le analisi differenziali hanno descritto che le 21 OTU DA erano appartenenti principalmente al genere di *Butyricimonas* e *Bacteroides* e descritti come più abbondanti in allevamento.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio ha come obiettivo quello di indagare l'effetto del trasporto dall'allevamento al macello sull'escrezione di *Salmonella* nei suini da ingrasso. Lo studio si è concentrato sulle interazioni tra il trasporto, la prevalenza e la carica di *Salmonella* e la composizione del microbiota fecale in entrambe le condizioni in allevamento e al macello.

L'impatto del trasporto dei suini dall'allevamento al macello sull'eliminazione di *Salmonella* è descritto in letteratura. Il trasporto è necessario nell'allevamento suino (Arguello *et al.*, 2013) ed è noto che un trasporto di durata superiore alle 2 ore dall'allevamento al macello possa stressare gli animali (Zou *et al.*, 2017). Questo stress è associato ad un aumento della carica di *Salmonella* dei suini portatori, determinando una diffusione di questo patogeno tra gli altri animali (Arguello *et al.*, 2013). Inoltre il trasporto comporta un rischio di infezione indiretta da superfici contaminate del camion o delle stalle di sosta (Magistrali *et al.*, 2008). Nel nostro studio, abbiamo osservato una prevalenza del 10,2% di animali positivi a *Salmonella* in allevamento e del 26,5% al macello, risultato coerente con i dati sulla prevalenza di *Salmonella* in Europa ed in Italia (EFSA, 2008). Gli isolati appartenevano alla *Salmonella* enterica 4,[5],12:i:- e *Salmonella* Rissen, che sono tra i sierotipi più frequentemente descritti in suini in Europa (Arguello *et al.*, 2012; Bonardi *et al.*, 2016; Pesciaroli *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda la carica di *Salmonella* nelle feci, questa è aumentata dall'allevamento al macello all'interno del gruppo. Come descritto nel nostro studio precedente, la carica di *Salmonella* è correlata alla contaminazione delle carcasse: pertanto, i suini con un'alta concentrazione di *Salmonella* nelle loro feci rappresentano un rischio più elevato per il consumatore rispetto ai *low-shedder* (Pesciaroli *et al.*, 2017). Coerentemente, la riduzione della carica di *Salmonella* nell'intestino è stata proposta come una delle strategie più efficaci per limitare il rischio umano di infezione da *Salmonella* (Snary *et al.*, 2016). I suini *high-shedder* sono probabilmente suini portatori che presentano una recrudescenza di infezione e/o suini che sono stati infettati durante il trasporto attraverso il contatto con animali positivi a *Salmonella* spp. Infatti, durante i periodi di stress, i suini portatori possono avere una recrudescenza dell'infezione e la conta di *Salmonella* nell'intestino e nelle feci può aumentare (Pesciaroli *et al.*, 2017).

Nel nostro studio, abbiamo rilevato come infezione da *Salmonella* abbia causato una variazione della composizione del microbiota fecale in suini infetti risultato in accordo con gli studi esistenti (Argüello *et al.*, 2018; Drumo *et al.*, 2016). Questa modificazione si è realizzata in poche ore e questo risultato è stato descritto sia trasversalmente, confrontando

cioè suini positivi e negativi al macello, sia longitudinalmente, confrontando il microbiota degli stessi animali, negativi in allevamento e positivi al macello.

La composizione del microbiota fecale descritta in animali negativi o positivi a *Salmonella* è in accordo con quanto già descritto in letteratura (Borewicz *et al.*, 2015; Drumo *et al.*, 2016; Kim and Isaacson, 2017). Nel nostro studio, infatti, abbiamo descritto una maggiore abbondanza di *Prevotella*, *Coprococcus* e *Paraprevotella* negli animali positivi a *Salmonella* e questo risultato è in accordo con gli studi condotti in condizioni controllate, a seguito di infezione sperimentale con *Salmonella* (Borewicz *et al.*, 2015; Drumo *et al.*, 2016; Kim and Isaacson, 2017). Inoltre, il microbiota fecale dei suini negativi ha mostrato una maggiore abbondanza di *Ruminococcaceae* rispetto ai suini positivi a *Salmonella*, risultando in accordo con la letteratura (Argüello *et al.*, 2019, 2018; Drumo *et al.*, 2016). È interessante notare che i suini positivi a *Salmonella* presentavano una maggiore diversità  $\beta$ , e quindi un microbiota intestinale più eterogeneo, rispetto agli animali negativi. In generale, il nostro studio e gli studi citati dimostrano chiaramente che la *Salmonella* porta ad alterazioni nella composizione del microbiota intestinale del maiale in allevamento o in condizioni sperimentali (Argüello *et al.*, 2019, 2018; Drumo *et al.*, 2016). In assenza di infezione da *Salmonella*, il trasporto sembra esercitare un effetto limitato sul microbiota fecale, e non provoca una evidente modifica della composizione del microbiota.

In conclusione, il nostro studio ha dimostrato che la carica di *Salmonella* aumenta dopo il trasporto, confermando che questa fase della catena di produzione è un punto critico per il controllo della contaminazione da *Salmonella*. In questa fase, un'infezione naturale da *Salmonella* provoca un profondo cambiamento del microbiota fecale, simile a quello osservato in condizioni sperimentali.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anonymous, 2012. EN ISO 6579-2:2012/A1. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff – Horizontal Method for the Detection of *Salmonella* spp. – Amendment 1: Annex D: Detection of *Salmonella* spp. in Animal Feces and in Environmental Samples from the Primary Production St.
2. Argüello, H., Álvarez-Ordoñez, A., Carvajal, A., Rubio, P., Prieto, M., 2013. Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production. *J. Food Prot.* 76, 899–911. doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-404
3. Argüello, H., Carvajal, A., Collazos, J.A., García-Feliz, C., Rubio, P., 2012. Prevalence and serovars of *Salmonella* enterica on pig carcasses, slaughtered pigs and the environment of four Spanish slaughterhouses. *Food Res. Int.* 45, 905–912. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.017
4. Argüello, H., Estellé, J., Leonard, F.C., Crispie, F., Cotter, P.D., O'Sullivan, O., Lynch, H., Walia, K., Duffy, G., Lawlor, P.G., Gardinerh, G.E., 2019. Influence of the Intestinal Microbiota on Colonization Resistance to *Salmonella* and the Shedding Pattern of Naturally Exposed Pigs. *mSystems* 4, 1–14.
5. Argüello, H., Estellé, J., Zaldívar-lópez, S., Jiménez-marín, Á., Carvajal, A., López-bascón, M.A., Crispie, F., Sullivan, O.O., Cotter, P.D., Priego-capote, F., Morera, L., Garrido, J.J., 2018. Early *Salmonella* Typhimurium infection in pigs disrupts Microbiome composition and functionality principally at the ileum mucosa. *Sci. Rep.* 8, 1–12. doi:10.1038/s41598-018-26083-3
6. Bearson, S.M.D., Allen, H.K., Bearson, B.L., Looft, T., Brunelle, B.W., Kich, J.D., Tuggle, C.K., Bayles, D.O., Alt, D., Levine, U.Y., Stanton, T.B., 2013. Profiling the gastrointestinal microbiota in response to *Salmonella*: Low versus high *Salmonella* shedding in the natural porcine host. *Infect. Genet. Evol.* 16, 330–340. doi:10.1016/j.meegid.2013.03.022
7. Berends, B.R., Van Knapen, F., Snijders, J.M.A., Mossel, D.A.A., 1997. Identification and quantification of risk factors regarding *Salmonella* spp. on pork carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 36, 199–206. doi:10.1016/S0168-1605(97)01267-1

8. Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
9. Bonardi, S., Bruini, I., Alpighiani, I., Vismarra, A., Barilli, E., Brindani, F., Morganti, M., Bellotti, P., Bolzoni, L., Pongolini, S., 2016. Influence of pigskin on salmonella contamination of pig carcasses and cutting lines in an italian slaughterhouse. *Ital. J. Food Saf.* 5, 65–68. doi:10.4081/ijfs.2016.5654
10. Borewicz, K.A., Kim, H.B., Singer, R.S., Gebhart, C.J., Sreevatsan, S., Johnson, T., Isaacson, R.E., 2015. Changes in the porcine intestinal microbiome in response to infection with *Salmonella enterica* and *Lawsonia intracellularis*. *PLoS One* 10, 1–16. doi:10.1371/journal.pone.0139106
11. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunencko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303
12. Dore, J., Ehrlich, S.D., Levenez, F., Pelletier, E., Alberti, A., Bertrand, L., Bork, P., Costea, P.I., Sunagawa, S., Guarner, F., Manichanh, C., Santiago, A., Zhao, L., Shen, J., Zhang, C., Versalovic, J., Luna, R.A., Petrosino, J., Yang, H., Li, S., Wang, J., E., A., Gloor, G., Singh, B., IHMS, C., 2015. IHMS\_SOP 06 V1: Standard operating procedure for fecal samples DNA extraction, Protocol Q. *Int. Hum. Microbiome Stand.*
13. Drumo, R., Pesciaroli, M., Ruggeri, J., Tarantino, M., Chirullo, B., Pistoia, C., Petrucci, P., Martinelli, N., Moscati, L., Manuali, E., Pavone, S., Picciolini, M., Ammendola, S., Gabai, G., Battistoni, A., Pezzotti, G., Alborali, G.L., Napolioni, V., Pasquali, P., Magistrali, C.F., 2016. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Modify Swine Intestinal Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5, 1–13. doi:10.3389/fcimb.2015.00106
14. EFSA, 2019. Scientific report on the European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA J.* 17. doi:10.2903/j.efsa.2019.5926
15. EFSA, 2008. Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection on the Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs, in the EU, 2006-2007 - Part A: *Salmonella* prevalence estimates. *EFSA J.* 6, 135r. doi:10.2903/j.efsa.2008.135r
16. Kim, H.B., Isaacson, R.E., 2017. *Salmonella* in Swine: Microbiota Interactions. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 5, 43–63. doi:10.1146/annurev-animal-022516-022834
17. Magistrali, C., Dionisi, A.M., De Curtis, P., Cucco, L., Vischi, O., Scuota, S., Zicavo, A., Pezzotti, G., 2008. Contamination of *Salmonella* spp. in a pig finishing herd, from the arrival of the animals to the slaughterhouse. *Res. Vet. Sci.* 85, 204–207. doi:10.1016/j.rvsc.2007.12.002
18. McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
19. Oksanen, J., 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R Doc.* 1–43. doi:10.1016/0169-5347(88)90124-3
20. Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods.*
21. Pesciaroli, M., Cucco, L., De Luca, S., Massacci, F.R., Maresca, C., Medici, L., Paniccià, M., Scoccia, E., Staffolani, M., Pezzotti, G., Magistrali, C.F., 2017. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 82–86. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.11.021
22. Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase,

- J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H.-W., Knight, R., Caporaso, J.G., 2014. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2, e545. doi:10.7717/peerj.545
23. Snary, E.L., Swart, A.N., Simons, R.R.L., Domingues, A.R.C., Vigre, H., Evers, E.G., Hald, T., Hill, A.A., 2016. A Quantitative Microbiological Risk Assessment for Salmonella in Pigs for the European Union. *Risk Anal.* 36, 437–449. doi:10.1111/risa.12586
24. TeamCore, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
25. Van Hoek, A.H.A.M., de Jonge, R., van Overbeek, W.M., Bouw, E., Pielaat, A., Smid, J.H., Malorny, B., Junker, E., Löfström, C., Pedersen, K., Aarts, H.J.M., Heres, L., 2012. A quantitative approach towards a better understanding of the dynamics of Salmonella spp. in a pork slaughter-line. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 45–52. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.013
26. WHO, 2007. White-Kauffman-Le Minor Scheme “Antigenic formulae of the Salmonella serovars- WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella,” 9th editio. ed.
27. Zou, Y., Hu, X.M., Zhang, T., Wei, H.K., Zhou, Y.F., Zhou, Z.X., Peng, J., 2017. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E supplementation on meat quality, stress response and intestinal morphology in pigs following transport stress. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 328–335. doi:10.1292/jvms.16-0576





# LA CARATTERIZZAZIONE DI *STREPTOCOCCUS SUI* ISOLATI DA FOCOLAI DI MALATTIA NEGLI ALLEVAMENTI ITALIANI RIVELA LA DIFFUSIONE DI NUOVI CLONI CON POTENZIALITA' ZONOSICA E RESISTENTI AGLI ANTIBIOTIVI

## ***STREPTOCOCCUS SUI* FROM DISEASED PIGS: EMERGENCE OF NEW SEQUENCE TYPES AND ANTIBIOTIC-RESISTANT STRAINS IN ITALY**

CUCCO L.<sup>1</sup>, PANICCIA' M.<sup>1</sup>, MASSACCI F.R.<sup>1</sup>, MORELLI A.<sup>1</sup>, ANCORA M.<sup>2</sup>,  
MANGONE I.<sup>2</sup>, DI PASQUALE A.<sup>2</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>, VIO D.<sup>4</sup>, ROLLA U.<sup>5</sup>, CAMMA' C.<sup>2</sup>,  
MAGISTRALI C.F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati";

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "Giuseppe caporale";

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini";

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

<sup>5</sup> Gruppo Martini s.p.a.

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, sierotipo, Sequence Type

**Key words:** *Streptococcus suis*, serotype, Sequence Type

### **RIASSUNTO**

*Streptococcus suis* è un importante patogeno, associato a una grave malattia nei suini e nell'uomo. Le infezioni umane hanno origine zoonotica dai suini. In questo studio abbiamo caratterizzato i sierotipi (SS), i *Sequence Type* (ST) e la suscettibilità agli antibiotici di 78 isolati di *S. suis* da focolai di infezione verificatisi negli allevamenti di suini italiani nel periodo 2017-2019. SS2 e SS9 sono responsabili di quasi il 70% delle infezioni. Tutti gli isolati SS2, tranne uno, sono confinati in un singolo cluster, mentre gli isolati SS9 sono distribuiti lungo l'albero filogenetico. Il cluster SS2 è composto da ST1 e ST7, che è associato a gravi infezioni umane in Cina e che non è mai stato rilevato nei suini europei. Un'ampia percentuale di isolati SS9, assegnati a ST123, è risultata resistente alla penicillina. Questo clone emergente minaccia il successo del trattamento dell'infezione da *S. suis*. Il nostro studio evidenzia l'importanza della caratterizzazione degli isolati di *S. suis* dai suini per una diagnosi precoce di cloni emergenti.

### **ABSTRACT**

*Streptococcus suis* is a major pathogen, associated with severe disease in pigs and in man. Human infections have a zoonotic origin from pigs. We characterized the serotypes (SS), sequence types (STs) and antibiotic susceptibility of 78 *S. suis* isolates from outbreaks of infection occurred on Italian pig farms during 2017-2019. SS2 and SS9 caused almost 70% of infections. All SS2 isolates, except one, were confined in a single cluster, while SS9 isolates were distributed along the phylogenetic tree. SS2 cluster was composed by ST1 and ST7, which is associated with severe human infections in China and which was never detected in European pigs. A large proportion of SS9 isolates, assigned to ST123, was resistant to penicillin. The emergence of this clone threatens the successful treatment of *S. suis* infection. Our study highlights the importance of the characterization of *S. suis* isolates from pigs for the early detection of emerging clones.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* è considerato uno dei patogeni più importanti nel settore suinicolo e un agente zoonotico emergente (Principalli et al., 2009). Nel suino *S. suis* è considerato un commensale delle vie aeree superiori, delle tonsille, del tratto enterico e genitale di animali sani che quindi possono fungere da *carrier* e trasmettere l'infezione ai soggetti sensibili, con la comparsa di manifestazioni cliniche, soprattutto in suini al di sotto delle 12 settimane di vita (Segura et al., 2017). Nel post-svezzamento, *S. suis* è associato a casi di setticemia, meningiti, polisierositi, endocarditi, artriti e polmoniti. Nell'uomo, negli ultimi anni è stato registrato un aumento dei casi di infezioni, condizioni setticemiche e meningiti causate da *S. suis*, soprattutto nei paesi asiatici dove la malattia è endemica. Diversamente, nei paesi occidentali la malattia è sporadica e di origine occupazionale (Goyette-Desjardins et al., 2014). *S. suis* è una specie eterogenea. Fino al 2005 i sierotipi capsulari di *S. suis* erano 35 (SS1-34 e 1/2), classificati sulla base delle caratteristiche antigeniche dei lipopolisaccaridi capsulari. Recenti studi hanno tuttavia dimostrato che sei di questi sierotipi (20, 22, 26, 32, 33 e 34) sono stati riclassificati come appartenenti ad altre specie del genere *Streptococcus*. Pertanto i sierotipi attualmente riconosciuti sono 29 (Louise Prüfer et al., 2019). La maggior parte delle infezioni nell'uomo e nel suino sono causate dal SS2 ma i sierotipi predominanti che causano malattie nei suini variano a seconda del periodo e dell'area geografica. In alcuni paesi Europei, inclusi Germania, Belgio, Spagna e Olanda, SS9 è diventato la principale causa di malattia nei suini (Zheng et al., 2018). Un aumento di *S. suis* SS9 è stato registrato recentemente anche in Cina. Il potenziale patogeno di ceppi di *S. suis* varia all'interno dello stesso sierotipo. Per discriminare gli isolati virulenti è stato proposto uno schema di tipizzazione molecolare basato sull'identificazione di 3 fattori di virulenza: *muraminidase-released protein* (MRP), *extracellular factor* (EF) e *suilysin* (SLY) (Goyette-Desjardins et al., 2014). A partire dal 2002 è stato introdotto uno schema di *multilocus sequence typing* (MLST) che ha permesso di migliorare la descrizione dell'epidemiologia delle infezioni causate da *S. suis*. I *Sequence Type* (ST) permettono di predire la patogenicità di un particolare isolato più del sierotipo (Estrada et al., 2019). Tra gli isolati di SS2 dei suini, ST1, un clone associato alla maggior parte dei casi umani a livello globale, è prevalente in Europa, mentre ST25 e ST28, che sono meno virulenti, predominano negli Stati Uniti e in Canada (Goyette-Desjardins et al., 2014). È interessante notare che un altro ST di SS2, ST7, è stato il responsabile delle principali epidemie da *S. suis* nell'uomo, verificatesi nel 1998 e nel 2005 in Cina (Ye et al., 2008). I sierotipi diversi da SS2 sono meno frequentemente associati a casi umani. Da notare che, nonostante le infezioni nel suino siano spesso causate da SS9, il primo caso umano di infezione da SS9 è stato documentato solo nel 2015, in Thailandia (Kerdsin et al., 2020). Questo ceppo SS9 è stato assegnato a ST16, un ST emergente noto per il suo maggiore potenziale di virulenza e predominanza nelle infezioni da *S. suis* nei suini nei Paesi Bassi (Willemse et al., 2019). La protezione conferita dai vaccini ad oggi disponibili non è eterologa, ma ristretta al sierotipo (O'Dea et al., 2018). Pertanto, in molti paesi europei, compresa l'Italia, il controllo delle infezioni da *S. suis* nei suini si basa principalmente sul trattamento antibiotico. *S. suis* è generalmente suscettibile ai beta-lattamici, la principale classe di antibiotici somministrati per controllare l'infezione negli allevamenti di suini. Al contrario, *S. suis* è quasi sempre resistente alla tetraciclina; macrolide-lincosamide-streptogramina B (MLSB); e, meno frequentemente, aminoglicosidi, cloramfenicolo, vancomicina e linezolid (Du et al., 2019). In *S. suis*, i geni che codificano la resistenza agli antibiotici sono spesso trasportati su elementi genetici mobili che possono essere trasferiti ad altri membri del genere, compresi i patogeni umani (Palmieri et al., 2011). Pertanto *S. suis* può essere considerato un problema di salute pubblica sia per il suo potenziale zoonotico che come riserva di geni di resistenza agli antibiotici. Le informazioni sui ceppi circolanti sono

essenziali. Tali informazioni sono lacunose in molti paesi, compresa l'Italia, che è uno dei più importanti paesi produttori di suini in Europa. Lo scopo di questo studio è stato quello di determinare i sierotipi, i ST e la suscettibilità agli antibiotici di ceppi di *S. suis* isolati da focolai negli allevamenti di suini italiani dal 2017 al 2019.

## MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 78 isolati di *S. suis* derivanti dall'attività diagnostica degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali Umbria-Marche, Lombardia-Emilia Romagna e delle Venezie nel periodo 2017-2019. Un isolato per allevamento è stato incluso nel presente lavoro. Gli isolati provenivano da 10 differenti regioni del Nord e Centro Italia e sono stati isolati da meningiti (49), pericarditi (1), artriti (3), setticemia (17) e polmoniti (8). Le colonie con morfologia riconducibile a *S. suis*, cresciute in Agar Sangue (5% globuli rossi di montone) a 37°C in CO<sub>2</sub>, sono state isolate e l'attribuzione di specie confermata mediante MALDI-TOF (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics). Le colonie sono state sottoposte a tipizzazioni molecolari per la determinazione del sierotipo capsulare (Okura et al., 2014) e dei geni codificanti i principali fattori di virulenza *mrp*, *sly* ed *epf* (Wisselink et al., 1999; (Silva et al., 2006); King et al., 2001). I DNA di ceppi appartenenti ai sierotipi 3 e 14, gentilmente forniti dal Prof. M. Gottschalk (Università di Montreal, Quebec, Canada), sono stati usati come controlli.

Successivamente gli isolati sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante metodo della diluizione in brodo, usando un pannello commerciale 96-wellmicrotitre MIC (BOP06F, Sensititre; Trek Diagnostic Systems Inc., England) seguendo le istruzioni della ditta produttrice. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 è stato usato come controllo di qualità.

Gli antibiotici testati e i relativi intervalli di concentrazione sono stati i seguenti: ampicillina (Amp) 0,25-16 µg/ml, ceftiofur (Cef) 0,25-8 µg/ml, enrofloxacin (Enr) 0,12-2 µg/ml, florfenicolo (Ffc) 0,25-8 µg/ml, penicillina (P) 0,12-8 µg/ml, tetraciclina (Te) 0,5-8 µg/ml e sulfametossazolo+trimetoprim (Sxt) 2/38 µg/ml. I valori di MIC sono stati interpretati usando i breakpoint del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI VET08 5th Edition, 2019) per *S. suis* (patologie respiratorie del suino) tranne Sxt per il quale sono stati utilizzati i breakpoint per *S. pneumoniae* per l'uomo.

Il DNA genomico di colture pure dei 78 isolati di *S. suis* è stato estratto utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen Inc., Hilden, Germany) per poi essere sottoposto a sequenziamento utilizzando una piattaforma Illumina NextSeq 500. Le sequenze ottenute sono state utilizzate per la determinazione del *Sequence Type* (ST) utilizzando *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>). I nuovi profili allelici e le nuove combinazioni di profili sono stati ottenuti caricando le sequenze *S. suis* MLST database (<https://pubmlst.org/ssuis/>).

I genomi sono stati poi annotati usando Prokka (Seemann, 2014) e analizzati per la costruzione di un albero filogenetico *maximum likelihood* (ML) con FastTree 2.1 (Price et al., 2010) e iTOL v.5.7 per le annotazioni manuali, utilizzando l'allineamento del *core genome* prodotto da Roary (Page et al., 2015).

## RISULTATI

Undici diversi sierotipi (SS) sono stati individuati in questo studio: 1-14, 2-1/2 (SS2), 4, 5, 7, 8, 9, 10, 15, 19, e 23. I SS2 e 9 sono stati rilevati più frequentemente, rispettivamente nel 34.6% (27) e 32.1% (25) degli isolati, seguiti dai SS10 (7, 9%) e SS7 (7.7%). L'analisi di MLST ha rilevato che 59 isolati (74.7%) appartengono a 9 ST (ST1, ST7, ST11, ST16, ST28, ST29, ST94, ST108, e ST123) già presenti nel *S. suis* MLST database, mentre i restanti 19 isolati (24.4%) appartengono a 10 nuovi ST (ST1540-ST1549). I dati relativi ai ST, i sierotipi

capsulari e i genotipi di virulenza dei 78 isolati inclusi in questo studio sono mostrati in Tabella 1. ST1 e ST123 sono i 2 ST predominanti con 17 isolati ognuno e rappresentano il 43% di tutti i ceppi analizzati. Tutti gli isolati appartenenti al ST29 sono SS7 e tutti gli isolati ST11 sono SS1-14. Gli isolati SS2 sono risultati piuttosto omogenei in quanto appartenenti al ST1 (63%) e in misura minore a ST7 (33%) e solo 1 isolato ST28. Grande omogeneità è stata riscontrata tra gli isolati appartenenti al SS7, tutti ST29, al SS10, tutti ST1547 e tra quelli appartenenti al SS1-14, tutti ST11. I più eterogenei sono risultati gli isolati SS9 risultati appartenere per la maggior parte (68%) a ST123 e ai ST: ST94 (4%), ST16 (12%), ST1540 (12%) e ST1541 (4%).

**Tabella 1.** Distribuzione dei geni di virulenza tra i ST. E' riportato il numero di isolati sul totale degli isolati per ogni ST (%)

**Table 1.** Combination of putative virulence genes among STs. The number of isolates out of the total of isolates for each ST are reported (%)

| <i>Sequence types</i> | <i>Sierotipi</i> | <i>Profilo di virulenza</i> | <b>Numero di isolati/Totale numero di isolati per ogni ST (%)</b> |
|-----------------------|------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| ST1                   | 2                | <i>mrp/sly/epf</i>          | 17/17 (100)                                                       |
| ST7                   | 2                | <i>mrp/sly/epf</i>          | 9/9 (100)                                                         |
| ST11                  | 1                | <i>mrp/sly/epf</i>          | 2/2 (100)                                                         |
| ST16                  | 9                | <i>mrp/sly</i>              | 3/3 (100)                                                         |
| ST28                  | 2                | <i>mrp/sly</i>              | 1/1 (100)                                                         |
| ST29                  | 7                | <i>mrp</i>                  | 3/6 (50)                                                          |
|                       |                  | <i>mrp</i>                  | 3/6 (50)                                                          |
| ST94                  | 4                | <i>mrp/sly</i>              | 2/3 (66.7)                                                        |
|                       | 9                | <i>mrp/sly</i>              | 1/3 (33.3)                                                        |
| ST108                 | 23               | <i>mrp/sly</i>              | 1/1 (100)                                                         |
| ST123                 | 9                | <i>mrp/sly</i>              | 17/17 (100)                                                       |
| ST1540                | 9                | -                           | 3/3 (100)                                                         |
| ST1541                | 9                | -                           | 1/1 (100)                                                         |
| ST1542                | 3                | -                           | 1/1 (100)                                                         |
| ST1543                | 4                | <i>mrp/sly</i>              | 1/1 (100)                                                         |
| ST1544                | 4                | <i>mrp/sly</i>              | 1/2 (50)                                                          |
|                       | 5                | <i>mrp/sly</i>              | 1/2 (50)                                                          |
| ST1545                | 8                | <i>mrp</i>                  | 1/1 (100)                                                         |
| ST1546                | 8                | <i>mrp/sly</i>              | 1/1 (100)                                                         |
| ST1547                | 10               | -                           | 7/7 (100)                                                         |
| ST1548                | 15               | <i>sly</i>                  | 1/1 (100)                                                         |
| ST1549                | 19               | -                           | 1/1 (100)                                                         |

La Tabella 2 mostra la distribuzione degli isolati di *S. suis* tra i differenti valori di MIC degli antibiotici testati. Sette isolati (9%) sono resistenti ad un unico antibiotico, solitamente la tetraciclina (6/7). La maggior parte degli isolati (48/78, 61.5%) è resistente a 2 antibiotici, (45/48) clindamicina e tetraciclina e infine 23/78 (29.5%) isolati sono risultati resistenti ad almeno 3 antibiotici e quindi classificati come multi-resistenti.

**Tabella 2.** Distribuzione dei valori di MIC tra i 78 isolati di *S. suis*. Tra parentesi sono indicate le percentuali. L'area colorata rappresenta il range di concentrazioni testate per ciascun antibiotico. Le linee verticali indicano la soglia per la resistenza secondo quanto indicato dal CLSI

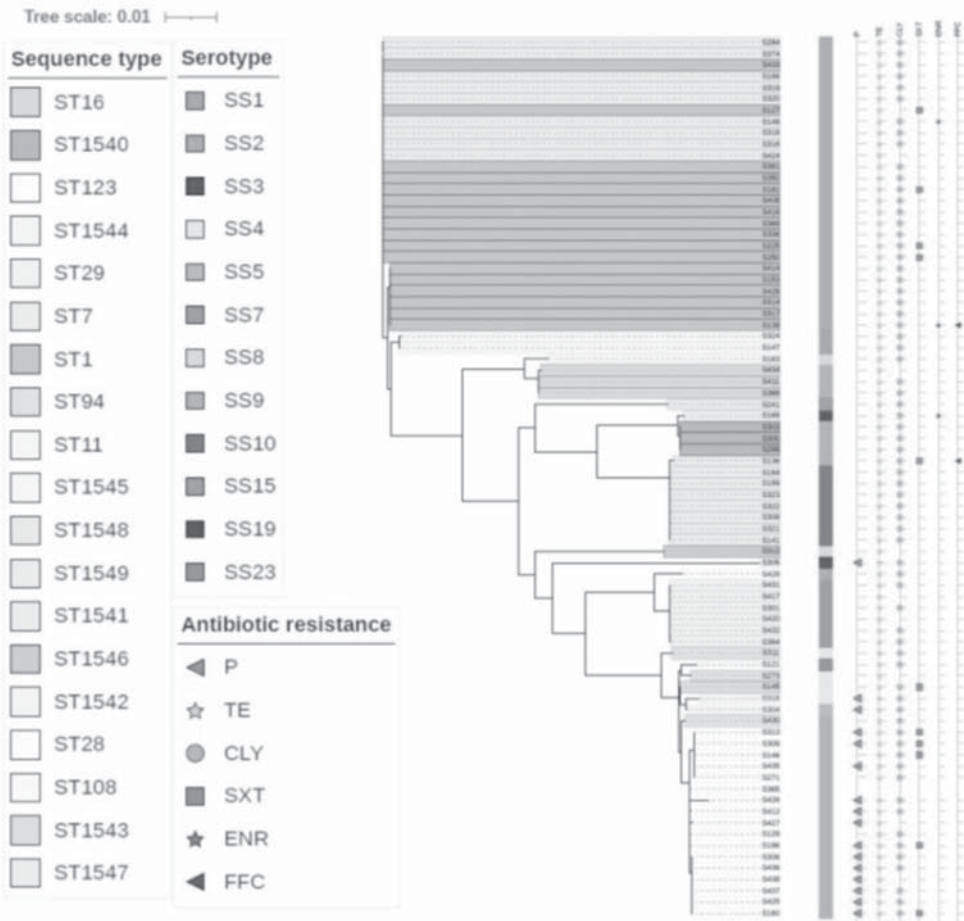
**Table 2.** Distribution of MIC values among the 78 *S. suis* isolates. Percentages are shown in brackets. Shades areas show the range of values actually tested for each antibiotic. Vertical bars indicate the threshold values for clinical resistance, according to CLSI

| Molecola antibiotica              | 0.12       | 0.25       | 0.5        | 1          | 2          | 4          | 8          | 16         | 32         | 64         | 128        | 256 | 512        |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|------------|
| Penicillina                       | 49<br>(63) | 7<br>(9)   | 5<br>(6)   | 14<br>(18) | 3<br>(4)   |            |            |            |            |            |            |     |            |
| Ampicillina                       |            | 73<br>(94) | 2<br>(3)   | 3<br>(4)   |            |            |            |            |            |            |            |     |            |
| Enrofloxacin                      |            | 1<br>(1)   | 17<br>(22) | 57<br>(73) | 2<br>(3)   | 1<br>(1)   |            |            |            |            |            |     |            |
| Tetraciclina                      |            |            |            | 1<br>(1)   | 3<br>(4)   | 1<br>(1)   |            | 73<br>(94) |            |            |            |     |            |
| Florfenicolo                      |            | 1<br>(1)   | 3<br>(4)   | 40<br>(51) | 32(41)     |            | 2<br>(3)   |            |            |            |            |     |            |
| Trimethoprim/<br>sulfamethoxazole |            |            |            |            | 67<br>(86) | 11<br>(14) |            |            |            |            |            |     |            |
| Clyndamycina                      |            | 8<br>(10)  |            |            |            | 4<br>(5)   | 4<br>(5)   | 10<br>(13) | 50<br>(64) |            |            |     |            |
| Tylosina                          |            |            | 15<br>(19) |            |            |            |            |            |            | 61<br>(78) |            |     |            |
| Neomicina                         |            |            |            |            |            | 22<br>(28) | 27<br>(35) | 15<br>(19) | 7<br>(9)   | 5<br>(6)   |            |     |            |
| Gentamicina                       |            |            |            | 12<br>(15) | 39<br>(50) | 17<br>(22) | 6<br>(8)   |            | 2<br>(3)   |            |            |     |            |
| SDM                               |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            | 19<br>(24) |     | 57<br>(73) |

L'albero filogenetico dei 78 isolati inclusi in questo studio è mostrato in Figura 1.

**Figura 1.** Albero filogenetico prodotto utilizzando iTOL (<https://itol.embl.de/>). L'albero contiene i 78 isolati di *Streptococcus suis* sequenziati nel presente studio. I *sequence type* (ST) ed i sierotipi (SS) di ciascun isolato sono rappresentati nell'albero. Le molecole resistenti agli antibiotici sono annotate da forme che indicano la presenza di penicillina (P, triangoli rossi), tetraciclina (TE, asterischi azzurri), clindamicina (CLY, cerchi rosa), trimethoprim / sulfametossazolo (SXT, quadrati blu), enrofloxacin (ENR, asterischi verdi) e florfenicolo (FFC, triangoli marroni).

**Figure 1.** Phylogenetic tree inferred using iTOL's interactive user interface (<https://itol.embl.de/>). The tree contains all 78 *Streptococcus suis* isolates sequenced in this study. Shading over tip labels indicates the sequence types (STs). The serotypes of each isolate are also shown. The antibiotic-resistant molecules are annotated by shapes indicating the presence of penicillin (P, red triangles), tetracycline (TE, light blue asterisks), clindamycin (CLY, pink circles), trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT, blue squares), enrofloxacin (ENR, green asterisks), and florfenicol (FFC, brown triangles).





L'analisi filogenetica mostra che gli isolati si raggruppano in 4 grandi *cluster*. Il primo *cluster* è composto dai SS1 e SS2 ed è caratterizzato da bassa eterogeneità nonostante questi isolati provenivano da differenti regioni e differenti organi. Il secondo *cluster* è composto dai 4 isolati SS8 e 9, mentre il terzo *cluster* è composto da 2 gruppi: il primo composto dai SS9, 15 e 23 e il secondo dai SS10 isolati da 7 casi di meningite, 6 dei quali in Piemonte (2018). Il quarto *cluster* comprende il maggior numero di isolati inclusi in questo studio, appartenenti a 6 differenti sierotipi. Non sono state osservate correlazioni con la localizzazione geografica, l'anno o l'origine degli isolati all'interno di quest'ultimo cluster ma tutti gli isolati SS9 resistenti alla penicillina sono raggruppati in questo *cluster*.

## DISCUSSIONE

Questo lavoro descrive i sierotipi, i ST e la suscettibilità agli antimicrobici di 78 isolati di *S. suis* provenienti da altrettanti focolai di streptococcosi in 78 allevamenti suini in Italia, dove una analisi della distribuzione dei ST non era stata intrapresa negli ultimi 20 anni. Oltre ad essere di aiuto in sanità animale, la caratterizzazione di *S. suis* dai suini è utile per tracciare le infezioni umane che originano dai suini. Nello popolazione oggetto di questo studio i 2 maggiori sierotipi di *S. suis* identificati sono stati SS2 e SS9, responsabili di circa il 70% dei casi. Precedenti studi condotti in Italia avevano mostrato che il numero di infezioni sostenute da SS9 erano di gran lunga inferiori a quelle causate da SS2 (Wisselink et al., 2000). Successivamente, SS9 è stato segnalato come sierotipo prevalente in una filiera integrata italiana (Sandri et al., 2015). Il numero di infezioni causate da SS2 e SS9 descritto in questo studio è circa equivalente, confermando un incremento delle infezioni sostenute da SS9 negli allevamenti suini. SS7 è il terzo sierotipo che è stato osservato, confermando il trend osservato anche in Germania (Louise Prüfer et al., 2019). I nostri dati indicano anche la presenza di SS10 e SS15 mai identificati in Italia ma già descritti in Spagna e UK (Wisselink et al., 2000). Tutti gli isolati SS2 eccetto uno, sono confinati all'interno di un unico cluster nell'albero filogenetico. Questo cluster è composto da isolati appartenenti al ST1, ST predominante e associato ad infezioni nei suini in Europa, e inaspettatamente da ST7. ST7 non è stato mai descritto nei suini in Europa (Goyette-Desjardins et al., 2014) ma è il ST prevalentemente associato a streptococcosi nei suini in Cina e responsabile di 2 epidemie di *S. suis* nell'uomo nel 1998 e nel 2005 (Guo et al., 2020). Per quanto riguarda il SS7, tutti gli isolati SS7 appartengono al ST29 e sono raggruppati all'interno di un unico cluster. SS7 appartenenti al ST29 sono stati descritti recentemente come causa di gravi infezioni nei suinetti in Germania e Austria. Per questo motivo ST29 è stato proposto come ST emergente in Europa (Rieckmann et al., 2018). Differentemente da quanto descritto per SS2, gli isolati SS9 sono distribuiti all'interno di differenti cluster nell'albero filogenetico e si raggruppano con isolati appartenenti ad altri sierotipi. Questa grande eterogeneità è stata già descritta per SS9. Tra gli isolati SS9, 3 risultano ST16, un clone dominante nei casi *S. suis* nei suini in Olanda. Sebbene la maggior parte dei casi di *S. suis* nell'uomo sono associati al ST1, recentemente in Tailandia alcuni casi umani sono stati attribuiti al ST16 (Willemse et al., 2019). Una larga porzione di SS9 sono stati assegnati al ST123, già descritto in Spagna nel 2009 e raggruppati all'interno di un unico cluster. Gli isolati ST123, molti di quali resistenti alla penicillina, sono risultati prevalenti tra i nostri isolati.

Per quanto riguarda la sensibilità agli antimicrobici, in questo studio abbiamo confermato la resistenza alla tetraciclina e alla clindamicina. La sensibilità al sulfametossazolo/trimetoprim e ai fluorochinoloni è generalmente più bassa nel nostro studio rispetto a studi condotti in altri paesi Europei (van Hout et al., 2016). Infine abbiamo osservato un elevato livello di resistenza alla penicillina con circa un isolato su cinque con una ridotta suscettibilità nei confronti di questa molecola.

Non è stata riscontrata resistenza nei confronti di ampicillina, confermando l'ipotesi di una incompleta cross-resistenza tra questi due antimicrobici.

## CONCLUSIONI

Questo studio conferma l'importanza di programmi di sorveglianza passiva della infezione da *S.suis* nella specie suina. Tale sorveglianza permetterebbe l'identificazione precoce di cloni con potenzialità zoonotiche o resistenti agli antibiotici. Per la prima volta, si è osservata la presenza di un clone resistente alla penicillina, non ristretta in termini geografici o di filiera produttiva. Tale riscontro è preoccupante sia in termini di sanità animale che di salute pubblica, e suggerisce fortemente l'adozione di misure preventive volte a limitarne la diffusione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Du, F., Lv, X., Duan, D., Wang, L., & Huang, J. (2019). Characterization of a Linezolid- and Vancomycin-Resistant *Streptococcus suis* Isolate That Harbors *optrA* and *vanG* Operons. *Frontiers in Microbiology*, 10(September), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02026>
2. Estrada, A. A., Gottschalk, M., Rossow, S., Rendahl, A., Gebhart, C., & Marthaler, D. G. (2019). Serotype and genotype (multilocus sequence type) of *Streptococcus suis* isolates from the United States serve as predictors of pathotype. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(9), 1–16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00377-19>
3. Goyette-Desjardins, G., Auger, J.-P., Xu, J., Segura, M., & Gottschalk, M. (2014). *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing. *Emerging Microbes & Infections*, 3(6), e45. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.45>
4. Guo, G., Du, D., Yu, Y., Zhang, Y., Qian, Y., & Zhang, W. (2020). Pan-genome analysis of *Streptococcus suis* serotype 2 revealed genomic diversity among strains of different virulence. *Transboundary and Emerging Diseases*, July, 1–11. <https://doi.org/10.1111/tbed.13725>
5. Kerdsin, A., Takeuchi, D., Nuangmek, A., Akeda, Y., Gottschalk, M., & Oishi, K. (2020). Genotypic comparison between *Streptococcus suis* isolated from pigs and humans in Thailand. *Pathogens*, 9(1), 4–11. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010050>
6. King, S. J., Heath, P. J., Luque, I., Tarradas, C., Dowson, C. G., & Whatmore, A. M. (2001). Distribution and genetic diversity of suilysin in *Streptococcus suis* isolated from different diseases of pigs and characterization of the genetic basis of suilysin absence. *Infection and Immunity*, 69(12), 7572–7582. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.12.7572-7582.2001>
7. Louise Prüfer, T., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., De Greeff, A., Willenborg, J., & Valentin-Weigand, P. (2019). Molecular typing of *Streptococcus suis* strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. *PLoS ONE*, 14(1), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210801>
8. O'Dea, M. A., Laird, T., Abraham, R., Jordan, D., Lugsomya, K., Fitt, L., Gottschalk, M., Truswell, A., & Abraham, S. (2018). Examination of Australian *Streptococcus suis* isolates from clinically affected pigs in a global context and the genomic characterisation of ST1 as a predictor of virulence. *Veterinary Microbiology*, 226(October), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.010>
9. Okura, M., Lachance, C., Osaki, M., Sekizaki, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Nakagawa, I., Hamada, S., Rossignol, C., Gottschalk, M., & Takamatsu, D. (2014). Development of a two-step multiplex PCR assay for typing of capsular polysaccharide synthesis gene clusters of *Streptococcus suis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(5), 1714–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.03411-13>
10. Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T. G., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., & Parkhill, J. (2015). Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*, 31(22), 3691–3693. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv421>

11. Palmieri, C., Princivalli, M. S., Brenciani, A., Valardo, P. E., & Facinelli, B. (2011). Different genetic elements carrying the tet(W) gene in two human clinical isolates of *Streptococcus suis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(2), 631–636. <https://doi.org/10.1128/AAC.00965-10>
12. Price, M. N., Dehal, P. S., & Arkin, A. P. (2010). FastTree 2 - Approximately maximum-likelihood trees for large alignments. *PLoS ONE*, 5(3), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009490>
13. Princivalli, M. S., Palmieri, C., Magi, G., Vignaroli, C., Manzin, A., Camporese, A., Barocci, S., Magistrali, C., & Facinelli, B. (2009). *Genetic diversity of Streptococcus suis clinical isolates from pigs and humans in Italy (2003–2007)*. *M*, 1–7.
14. Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., & Baums, C. G. (2018). *Streptococcus suis* cps7: An emerging virulent sequence type (ST29) shows a distinct, IgM-determined pattern of bacterial survival in blood of piglets during the early adaptive immune response after weaning. *Veterinary Research*, 49(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0544-8>
15. Sandri G., Giovanardi D., Pesente P., Rossi G. Studio dell'epidemiologia di *Streptococcus suis* (mediante utilizzo di sierotipizzazione e determinazione della presenza di fattori di virulenza) e della resistenza antimicrobica (AMR) in una filiera produttiva italiana. Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento del Suino, 2015, pag. 193-197.
16. Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>
17. Segura, M., Fittipaldi, N., Calzas, C., & Gottschalk, M. (2017). Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical? *Trends in Microbiology*, 25(7), 585–599. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005>
18. Silva, L. M. G., Baums, C. G., Rehm, T., Wisselink, H. J., Goethe, R., & Valentin-Weigand, P. (2006). Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR. *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.12.013>
19. Willemse, N., van der Ark, K. C. H., Stockhofe-Zurwieden, N., Smith, H., Picavet, D. I., van Solt-Smits, C., Wisselink, H. J., Schultsz, C., & de Greeff, A. (2019). Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0>
20. Wisselink, H. J., Reek, F. H., Vecht, U., Stockhofe-Zurwieden, N., Smits, M. A., & Smith, H. E. (1999). Detection of virulent strains of *Streptococcus suis* type 2 and highly virulent strains of *Streptococcus suis* type 1 in tonsillar specimens of pigs by PCR. *Veterinary Microbiology*, 67(2), 143–157. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00036-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00036-X)
21. Ye, C., Bai, X., Zhang, J., Jing, H., Zheng, H., Du, H., Cui, Z., Zhang, S., Jin, D., Xu, Y., Xiong, Y., Zhao, A., Luo, X., Sun, Q., Gottschalk, M., & Xu, J. (2008). Spread of *Streptococcus suis* sequence type 7, China. *Emerging Infectious Diseases*, 14(5), 787–791. <https://doi.org/10.3201/eid1405.070437>
22. Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A. I., & Gottschalk, M. (2018). Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. *Veterinary Research*, 49(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0498-2>



# **INFEZIONI DA PCV2, PCV3 E PORCINE CIRCOVIRUS-LIKE VIRUS P1 NEI SUINI DI ALLEVAMENTO E NEI CINGHIALI SELVATICI**

## **INFECTIONS BY PCV2, PCV3 AND CIRCOVIRUS-LIKE VIRUS P1 IN FARMED SWINE AND WILD BOARS**

FACCINI S., FERRARINI G., BARBIERI I., BONIOTTI M.B., ALBORALI L.G.,  
LUPPI A., CHIAPPONI C., BONILAUDI P., GRADASSI M., VENTURA G.,  
MORENO A., GIBELLI L.R., PEZZONI G., ROSIGNOLI C.

*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna*

**Parole chiave:** PCV2, PCV3, porcine circovirus-like virus P1

**Key words:** PCV2, PCV3, porcine circovirus-like virus P1

### **RIASSUNTO**

Sono presentati i dati raccolti nell'ambito del progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute sulle infezioni da PCV2, PCV3 e porcine circovirus-like virus P1 nei suini di allevamento e cinghiali selvatici. Sono stati analizzati campioni conferiti presso le sedi territoriali dell'IZSLER per monitoraggio periodico o diagnosi di patologia da dicembre 2017 e dicembre 2019. I dati raccolti dimostrano l'attiva circolazione di PCV3 nelle due popolazioni, senza evidenziare stretta relazione tra infezione e patologia. Si è confermata, invece, una correlazione tra titoli virali elevati per PCV2 ( $>10^6$  copie/mL o g di tessuto) e la presenza di patologia nei suini di allevamento. Inoltre, la positività a PCV2 e i titoli virali sono risultati significativamente più bassi nei suini d'allevamento rispetto ai cinghiali selvatici mettendo in luce l'efficacia della vaccinazione. PCV2d è risultato il genotipo prevalente (67.65%), negli allevamenti, mentre nei cinghiali selvatici è prevalente il PCV2b (59.68%). In due allevamenti è stata inoltre riscontrata la circolazione di PCV2a, assente nei cinghiali selvatici analizzati. Porcine circovirus-like virus P1 descritto in Cina, dove circola almeno dal 2005, non è stato rilevato in nessuna delle due popolazioni oggetto di studio. I dati raccolti necessitano di ulteriori elaborazioni, ma evidenziano la necessità di approfondire sempre più le conoscenze sui circovirus infettanti i suini, soprattutto in considerazione della natura multifattoriale delle malattie ad essi associate, che presentano tuttora numerosi aspetti sconosciuti.

### **SUMMARY**

The study presents data collected as part of a research project, funded by the Ministry of Health, concerning infections by PCV2, PCV3 and porcine circovirus-like virus P1 on samples from farmed pigs and wild boars delivered to the territorial laboratories of the IZSLER for periodic monitoring or diagnosis of pathology from December 2017 and December 2019. The data obtained highlighted the intense circulation of PCV3 among farmed pigs and wild boars, without evidence of strict correlation between infection and disease. On the other hand, a correlation between high viral titers for PCV2 and disease conditions was confirmed. Moreover, the different prevalence of PCV2 in farmed pigs and wild boars highlighted the effectiveness of vaccination. PCV2d was the prevalent genotype (67.65%) in farmed pigs, while PCV2b was the most frequent in wild boars (59.68%) samples. PCV2a was found in two farms. Further analysis of the sequence data, it will significantly expand the value of the work. The presence of circovirus-like virus P1 was not detected neither in farmed pigs nor

in wild boars. The data presented require further processing, but highlight the necessity to deepen the knowledge on circoviruses infecting pigs.

## INTRODUZIONE

Nonostante il successo della vaccinazione, PCV2 rappresenta ancora una minaccia importante per la salute e la produzione di suini in tutto il mondo (Afolabi, et al, 2017, Opriessnig and Langohr, 2013). La diversità e la natura multifattoriale delle malattie da circovirus (PCVD), la notevole variabilità genetica di PCV2 e l'assenza di immunità sterilizzante contribuiscono alla complessità del problema. Ne consegue che la comprensione dei fattori che determinano l'emergere di nuovi genotipi prevalenti sia di primaria importanza (Franzo, Giovanni, et al, 2016). PCV2 comunemente infetta anche i cinghiali. Pochi sono però gli studi di epidemiologia molecolare sulle infezioni da PCV2 nei cinghiali selvatici, o che confrontino i ceppi circolanti in campo in aziende vaccinate e non. Alcune analisi delle sequenze disponibili in GenBank suggeriscono la presenza di forze selettive dovute alla vaccinazione (Franzo, Giovanni, et al, 2016, Karuppannan and Opriessnig, 2017).

Fino ad alcuni anni fa, PCV2 era considerato l'unica specie del genere *Circovirus* patogena per i suini. Ma il quadro dei circovirus infettanti i suini si sta facendo più complesso. È stata infatti descritta una nuova specie di circovirus, Porcine Circovirus 3 (PCV3), associata a forme cliniche simili a PCVD (Palinski, et al, 2017, Phan, et al, 2016). In Cina inoltre è stato descritto un nuovo virus, non ancora classificato, caratterizzato da un genoma ridotto (648 nt), molto simile a PCV2 e per questo denominato porcine circovirus-like virus P1 (P1). Diffuso in Cina (Wen, et al, 2012, Wen, et al, 2018), è stato associato a simili a PCV-SD e a tremori congeniti. Nessuno studio, che ne confermi o ne smentisca la presenza in altre parti del mondo è stato fino ad ora pubblicato.

Nel 2019, inoltre è stato rilevato un ulteriore circovirus, denominato PCV4 in suini con forme respiratorie, diarrea e in alcuni casi lesioni della cute simili alla sindrome Dermatite-Nefrite (PDNS) (Zhang, et al, 2020). Un recente studio non ha dimostrato la presenza del nuovo virus in Italia e Spagna (Franzo, G., et al, 2020). PCV3, al contrario, può considerarsi un virus emergente. Indagini virologiche e sierologiche condotte negli Stati Uniti e in Cina e in numerosi paesi hanno evidenziato come PCV3 circoli comunemente nella popolazione suina, con una prevalenza dal 12 al 59% (Palinski, et al, 2017). Alcuni studi dimostrano che le infezioni subcliniche sono comuni (Stadejek, et al, 2017, Zheng, et al, 2018), ma in alcune condizioni PCV3 sembra essere l'agente eziologico di disturbi riproduttivi e di forme simili a malattia sistemica da circovirus (PCV-SD) e a PDNS (Ku, et al, 2017, Phan, et al, 2016, Palinski, et al, 2017). Non può essere dunque al momento scartata l'ipotesi che, come per PCV2 (Ellis, 2014), anche gli esiti delle infezioni da PCV3 e P1 siano influenzati da co-infezioni, super-infezioni, e fattori come le pratiche di allevamento e i protocolli di vaccinazione.

Da qui l'importanza di uno studio che consenta non solo di acquisire fondamentali informazioni sulla presenza, circolazione e patologie correlate alle infezioni da PCV2, PCV3 e P1 nei suini di allevamento e cinghiali selvatici.

## MATERIALI E METODI

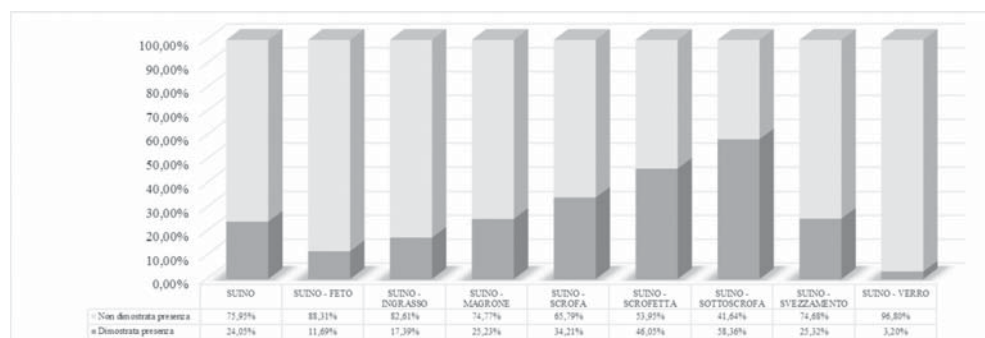
*Suini da allevamento*—Sono stati analizzati campioni conferiti alle sedi territoriali dell'IZSLER per la diagnosi di PCVD e per sorveglianza periodica (sulla base dei dati anamnestici), nel periodo da dicembre 2017 a dicembre 2019. *Animali selvatici (cinghiali)*— Sono stati analizzati campioni (polmoni, milza, linfonodi) da cinghiali conferiti ai laboratori diagnostici dell'IZSLER per la sorveglianza delle malattie infettive della fauna selvatica da dicembre 2017 a dicembre 2019. *Test diagnostici* — La ricerca di PCV2 è stata eseguita secondo quanto



precedentemente descritto (Opriessnig, et al, 2003). I campioni sono stati analizzati per PCV3 mediante Real-Time PCR utilizzando primer precedentemente descritti (Palinski, et al, 2017) ed una sonda Taqman appositamente disegnata. La ricerca di P1 è stata eseguita come precedentemente descritto (He, et al, 2015). Sono stati registrati eventuali agenti confettanti emersi dalle indagini diagnostiche, inoltre, in tutti i cinghiali ed in alcuni campioni di suini d'allevamento è stata ricercata la presenza di PPV1-6 secondo il protocollo descritto da Opriessnig et al. (2014). *Caratterizzazione molecolare dei ceppi*—La genotipizzazione dei ceppi di PCV2 mediante Real-Time PCR è stata effettuata secondo quanto precedentemente indicato (Opriessnig, et al, 2013, Opriessnig, et al, 2010). Sono stati inoltre disegnati alcuni primer da utilizzare come PCR end-point per la caratterizzazione di PCV2c. Per campioni positivi con Cq  $\leq 30$  a PCV2 o PCV3 è stato tentato il sequenziamento. Le sequenze di ORF2 e del genoma di ceppi di PCV3 sono state ottenute, mediante sequenziamento Sanger, secondo quanto indicato da Palinski et al. (2016 e 2017). *Analisi di sequenze*—L'allineamento delle sequenze è stato realizzando con ClustalW utilizzando MEGA6 (Tamura, et al, 2013) con il quale sono anche state effettuate le analisi filogenetiche preliminari.

## RISULTATI

*Suini da allevamento* - Sono stati analizzati per PCV3, 1178 campioni (comprendenti sieri, linfonodi, tamponi nasali, fluidi orali, fluidi testicolari, tessuto cardiaco) di suini di allevamento. I campioni appartenevano a 511 conferimenti pervenuti presso le sedi territoriali IZSLER, provenienti da 207 allevamenti dislocati in 26 province italiane, principalmente nella Pianura Padana. I soggetti campionati comprendono tutte le fasi del ciclo produttivo, dai feti al finissaggio. Complessivamente il 32,09% dei campioni analizzati è risultato positivo per PCV3, il 36,79% dei conferimenti aveva almeno un campione positivo. In totale, nel 44,5% degli allevamenti campionati è stata dimostrata la presenza del virus. Organizzando i dati per le categorie di animali (Figura 1) si è osservato che la massima frequenza di campioni positivi è stata registrata nei suini sottoscrofa (58,36%), seguita da quella delle scrofette (46,1%) e delle scrofe (34,21%).



**Figura 1:** Frequenza campioni positivi a PCV3 nelle varie categorie di suini da allevamento. Nella categoria “SUINO” sono raccolti i campioni dei soggetti la cui età non era definita.

**Figure 1:** Frequency of PCV3 positive samples in the different categories of farmed pigs. In the “SUINO” category, samples of not classified subjects are collected.

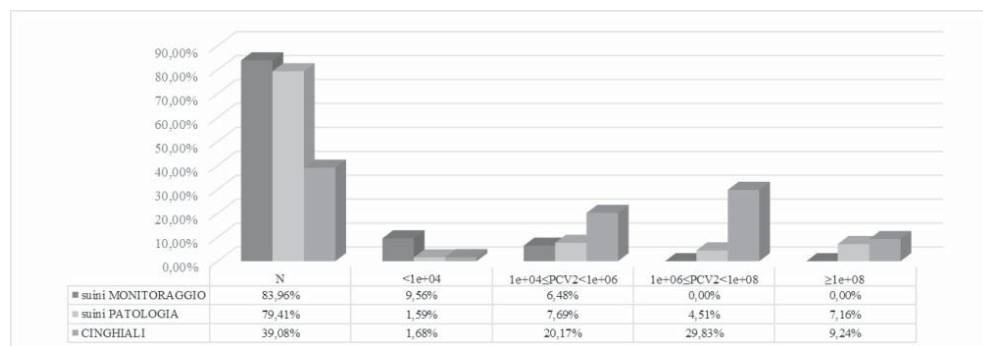
Il 56,03% dei campioni analizzati per PCV3 apparteneva a conferimenti per monitoraggio, il 40,41% per diagnostica di patologie, mentre del 3,56% dei campioni non si avevano



informazioni sul motivo del conferimento. I campioni positivi rappresentano il 40.52% dei campioni per monitoraggio e 19.75% di quelli per patologia. I campioni sono stati classificati in base al titolo virale. Sia per i campioni per monitoraggio che per patologia i campioni negativi rappresentano la classe più frequente seguita da quella con titoli virali da  $10^4$  a  $10^6$  copie genoma/g o mL. Da sottolineare che in alcuni campioni di feti sono stati rilevati titoli virali  $>10^{10}$  copie/g.

Sono stati analizzati per PCV2 704 campioni da suini di allevamento, provenienti da 161 allevamenti. Tutti gli allevamenti coinvolti seguivano un programma di vaccinazione per PCV2. Il 44% dei campioni era da conferimenti per monitoraggio, la restante per diagnosi di patologie. L'80,39% dei campioni analizzati è risultato negativo per PCV2. Suddividendo i campioni positivi in classi di positività è stata confrontata la distribuzione dei campioni conferiti per monitoraggio e quelli per diagnosi di patologie (Figura 2). Si è così evidenziato che i campioni conferiti per monitoraggio avevano titoli virali  $<10^6$  copie/g o mL. La maggior parte dei campioni con titolo virale  $>10^8$  copie/g o mL, invece, erano relativi a conferimenti per diagnosi di PCV-SD, mentre due casi si riferivano a feti. Per quanto riguarda i genotipi riscontrati, PCV2d (67.65%) è risultato il genotipo prevalente nei suini di allevamento, seguito da PCV2b (26.47%). In due allevamenti è stata riscontrata la circolazione di PCV2a, mentre in nessun campione, è stato rilevato PCV2c o altri genotipi. I campioni da soggetti con quadro tipico da PCVD, risultati negativi per PCV2 e PCV3 sono stati inoltre analizzati per la presenza di P1, con esito negativo. Per quanto riguarda l'analisi delle co-infezioni è possibile osservare che il 34,7% dei campioni positivi per PCV3 era anche positivo a PCV2. Si è evidenziato inoltre che nel caso di PCV2, le proporzioni di campioni positivi a PPV1, PPV2, PPV6 e PRRS sono significativamente più alte nei campioni con titoli virali elevati rispetto ai negativi e debolmente positivi.

**Cinghiali selvatici** - Sono stati inoltre analizzati per la presenza di PCV2, PCV3 e P1, 245 campioni di cinghiali selvatici provenienti da 7 province del nord d'Italia. Come per i suini di allevamento, anche nei cinghiali selvatici non è stata rilevata la presenza di P1. Tutti i cinghiali analizzati erano soggetti adulti che non hanno evidenziato lesioni macroscopiche riconducibili a patologie in sede autoptica. Il 53.47% dei campioni di tessuti prelevati dai cinghiali è risultato positivo per PCV3. Il 60.92% dei campioni di cinghiali selvatici è risultato positivo per PCV2. La suddivisione dei campioni in classi di positività per il virus PCV2, è stata confrontata con quella dei suini di allevamento (Figura 2).



**Figura 2:** Classi di positività a PCV2 nei suini da allevamento per monitoraggio e patologia e nei cinghiali selvatici

**Figure 2:** Classes of PCV2 positivity in wild boars and farmed pigs with or without clinical signs.

Per quanto riguarda i genotipi riscontrati mediante Real-Time PCR e sequenziamento, PCV2b è il prevalente nei cinghiali selvatici (59.68%) rispetto al PCV2d (38.71%). Non sono stati rilevati ceppi PCV2c e PCV2a o altri genotipi in questa popolazione. Come per i suini d'allevamento, per l'analisi delle co-infezioni, occorreranno ulteriori elaborazioni statistiche dei dati. Come la positività a PCV2 e PCV3 anche la positività a PPV1, PPV2, PPV3 nei cinghiali è in generale più alta che nei suini.

*Analisi filogenetiche* - I primi dati delle analisi filogenetiche delle sequenze di ORF2 e dell'intero genoma dei ceppi di PCV2 e PCV3 ottenute dai suini da allevamento e dai cinghiali selvatici mostrano che nella maggior parte dei casi i ceppi circolanti nelle due popolazioni appartengono a clusters diversi, ma vi sono evidenze di possibili scambi tra le due popolazioni.

## DISCUSSIONE

I dati raccolti nel presente progetto di ricerca hanno dimostrato l'attiva circolazione di PCV3 nei suini d'allevamento e nei cinghiali selvatici. In totale, nel 44.5% degli allevamenti campionati è stata dimostrata la presenza del virus. Complessivamente il 32,09% dei campioni analizzati è risultato positivo per PCV3, in particolare il 36.79% dei conferimenti aveva almeno un campione positivo. I dati sulla prevalenza di PCV3 riportati in letteratura, variano molto da studio e studio, ma sicuramente la positività riscontrata nell'area della Pianura Padana nel corso di questo progetto è molto alta. Uno studio sulla circolazione di PCV3 in allevamenti negli Stati Uniti ha rilevato una proporzione molto simile di allevamenti positivi a (44%) (Wang, et al, 2019). Molto importanti sono i dati raccolti relativamente alla ripartizione dei positivi nelle varie categorie di animali. La massima frequenza di campioni positivi è stata registrata nei suini sottoscrofa (58.5%), seguita da quella delle scrofette (46.05%) e delle scrofe (34.21%). Questo induce a pensare che l'infezione sia spesso molto precoce, entro i primi giorni di vita, o addirittura si può ipotizzare che molti suinetti nascano già infetti. I dati raccolti inoltre non emerge che l'infezione da PCV3 sia fortemente legata a forme cliniche. La positività è risultata infatti più alta nei soggetti campionati per monitoraggio (40.52%) rispetto a quelli per patologia (19.75%). Nemmeno l'analisi dei titoli virali dimostra che ci siano titoli virali significativamente più alti nei soggetti con patologia rispetto a quelli campionati per monitoraggio. Resta sicuramente da indagare la positività nei feti spesso con titoli virali molto elevati e nel siero di scrofe con aborto. Anche la positività nei tessuti dei cinghiali (53.47%), apparentemente in buone condizioni di salute, non supporta una correlazione dell'infezione con condizioni patologiche. All'inizio di questo studio nessun dato era stato pubblicato sull'infezione da PCV3 nei cinghiali selvatici. Recentemente sono stati resi disponibili i dati di due ricerche, una sui sieri di cinghiali del parco regionale dei colli Euganei (Franzo, Giovanni, et al, 2018) ed una effettuata su sieri e tessuti della popolazione di cinghiali della Catalogna (Klaumann, et al, 2019). La percentuale di campioni positivi riscontrata nella presente indagine (53.47%) è molto più alta di quella dei cinghiali del parco dei colli Euganei (circa 30%) ed è più simile a quella della Catalogna (53,66%). Come osservato negli altri studi, comunque, è possibile affermare che i dati si discostano da quanto rilevato nella popolazione dei suini di allevamento.

Diverso è il quadro che emerge dai dati di PCV2 raccolti sui campioni di suini da allevamento. L'80,39% dei campioni analizzati è negativo per PCV2 (79.05% dei campioni conferiti per diagnosi di patologie, 83.96% dei campioni conferiti per monitoraggio). Si è confermato, come più volte riportato in letteratura, che i campioni conferiti per monitoraggio hanno titoli virali  $<10^6$  copie/g o mL. La maggior parte dei campioni con titolo virale  $>10^8$  copie/g, invece, erano relativi a conferimenti per diagnosi di PCV-SD, mentre due casi si riferivano a feti.

L'infezione nei cinghiali selvatici è molto frequente: 53.47% dei campioni è risultato positivo.

Pur trattandosi di specie diverse, confrontato con la positività intorno al 20% nei suini d'allevamento il dato potrebbe essere ascrivibile all'effetto della vaccinazione, considerando anche che la proporzione di campioni con titoli virali da  $10^4$  a  $10^6$  copie/g e da  $10^6$  a  $10^8$  copie/g è significativamente maggiore nei cinghiali. Molto interessante è l'analisi dei genotipi riscontrati. Nei suini d'allevamento il genotipo prevalente è PCV2d (67.65%), seguito da PCV2b. In due allevamenti inoltre stata riscontrata la circolazione di PCV2a assente nei cinghiali. PCV2b è il genotipo preponderante nei cinghiali selvatici (59.68%) seguito da PCV2d. PCV2c o altri genotipi non sono stati rilevati in nessuna delle due popolazioni.

Sia nei suini di allevamento, che nei cinghiali selvatici non è stato rilevato P1, mentre in Cina è stato riportato nel 19% circa dei campioni analizzati (Wen, et al, 2017).

Per quanto riguarda l'analisi delle co-infezioni, occorreranno ulteriori elaborazioni statistiche dei dati. È possibile comunque osservare che il 34,7% dei positivi a PCV3 era anche positivo a PCV2. Inoltre per PCV2, le proporzioni di campioni positivi a PPV1, PPV2, PPV6 e PRRS sono sensibilmente più alte nei campioni con titoli virali elevati rispetto ai negativi e debolmente positivi, a conferma di quanto già noto su questo virus.

## CONCLUSIONI

I dati, raccolti nell'ambito di questo progetto di ricerca corrente finanziato dal Ministero della Salute (IZSLER2017007 RC), avvalorano la necessità di approfondire sempre più le conoscenze sui circovirus infettanti i suini, soprattutto per la natura multifattoriale delle malattie ad essi associate, che presentano tuttora numerosi aspetti sconosciuti.

## BIBLIOGRAFIA

1. Afolabi K.O., B.C. Iweriebor, A.I. Okoh and L.C. Obi, 2017: Global Status of Porcine circovirus Type 2 and Its Associated Diseases in Sub-Saharan Africa. *Adv. Virol.* 2017, 6807964.
2. Ellis J., 2014: Porcine Circovirus: A Historical Perspective. *Veterinary Pathology Online* 51, 315-327.
3. Franzo G., A. Ruiz, L. Grassi, M. Sibila, M. Drigo and J. Segales, 2020: Lack of Porcine circovirus 4 Genome Detection in Pig Samples from Italy and Spain. *Pathogens* 9, 10.3390/pathogens9060433.
4. Franzo G., C.M. Tucciarone, M. Cecchinato and M. Drigo, 2016: Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Scientific Reports* 6, 39458.
5. Franzo G., C.M. Tucciarone, M. Drigo, M. Cecchinato, M. Martini, A. Mondin and M.L. Menandro, 2018: First report of wild boar susceptibility to Porcine circovirus type 3: High prevalence in the Colli Euganei Regional Park (Italy) in the absence of clinical signs. *Transbound Emerg Dis* 65, 957-962.
6. He K.W., L.B. Wen, Y.S. Wang and C.P. Lu, 2015: Development of real-time PCR assay for detection of porcine circovirus-like virus P1 in domestic pigs in China. *BMC Vet. Res.* 11, 240-3.
7. Karuppannan A.K. and T. Opriessnig, 2017: Porcine Circovirus Type 2 (PCV2) Vaccines in the Context of Current Molecular Epidemiology. *Viruses* 9, 10.3390/v9050099.
8. Klaumann F., F. Correa-Fiz, M. Sibila, J.I. Nunez and J. Segales, 2019: Infection dynamics of porcine circovirus type 3 in longitudinally sampled pigs from four Spanish farms. *Vet. Rec.* 184, 619.
9. Ku X., F. Chen, P. Li, Y. Wang, X. Yu, S. Fan, P. Qian, M. Wu and Q. He, 2017: Identification and genetic characterization of porcine circovirus type 3 in China. *Transbound Emerg. Dis.* 64, 703-708.

10. Opriessnig T. and I. Langohr, 2013: Current state of knowledge on porcine circovirus type 2-associated lesions. *Vet. Pathol.* 50, 23-38.
11. Opriessnig T., J.R. Prickett, D.M. Madson, H.G. Shen, N.M. Juhan, R.R. Pogranichniy, X.J. Meng and P.G. Halbur, 2010: Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and reinoculation with homologous or heterologous strains: virological, serological, pathological and clinical effects in growing pigs. *Vet. Res.* 41, 31.
12. Opriessnig T., C.T. Xiao, P.F. Gerber and P.G. Halbur, 2013: Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2. *Vet. Microbiol.* 163, 177-183.
13. Opriessnig T., S. Yu, J.M. Gallup, R.B. Evans, M. Fenaux, F. Pallares, E.L. Thacker, C.W. Brockus, M.R. Ackermann, P. Thomas, X.J. Meng and P.G. Halbur, 2003: Effect of vaccination with selective bacterins on conventional pigs infected with type 2 porcine circovirus. *Vet. Pathol.* 40, 521-529.
14. Palinski R., P. Piñeyro, P. Shang, F. Yuan, R. Guo, Y. Fang, E. Byers and B.M. Hause, 2017: A novel porcine circovirus distantly related to known circoviruses is associated with porcine dermatitis and nephropathy syndrome and reproductive failure. *Journal of virology* 91.
15. Phan T.G., F. Giannitti, S. Rossow, D. Marthaler, T.P. Knutson, L. Li, X. Deng, T. Resende, F. Vannucci and E. Delwart, 2016: Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation. *Virol J* 13.
16. Stądejek T., A. Woźniak, D. Milek and K. Biernacka, 2017: First detection of porcine circovirus type 3 on commercial pig farms in Poland. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 1350-1353.
17. Tamura K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar, 2013: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725-2729.
18. Wang Y., L. Noll, N. Lu, E. Porter, C. Stoy, W. Zheng, X. Liu, L. Peddireddi, M. Niederwerder and J. Bai, 2019: Genetic diversity and prevalence of porcine circovirus type 3 (PCV3) and type 2 (PCV2) in the Midwest of the USA during 2016–2018. *Transbound Emerg Dis* n/a.
19. Wen L., K. He, Q. Xiao, Z. Yu, A. Mao, Y. Ni, X. Zhang, B. Li, X. Wang, R. Guo, J. Zhou, L. Lv and J. Jiang, 2012: A novel porcine circovirus-like agent P1 is associated with wasting syndromes in pigs. *PLoS One* 7, e41565.
20. Wen L., F. Jiao, D. Zhang, A. Mao, C. Liu, J. Xie and K. He, 2017: Genome sequence of a porcine circovirus-like virus P1 mutant in China. *Arch. Virol.* 162, 585-586.
21. Wen L., A. Mao, F. Jiao, D. Zhang, J. Xie and K. He, 2018: Evidence of porcine circovirus-like virus P1 in piglets with an unusual congenital tremor. *Transbound Emerg. Dis.* 65, e501-e504.
22. Zhang H.H., W.Q. Hu, J.Y. Li, T.N. Liu, J.Y. Zhou, T. Opriessnig and C.T. Xiao, 2020: Novel circovirus species identified in farmed pigs designated as Porcine circovirus 4, Hunan province, China. *Transbound Emerg. Dis.* 67, 1057-1061.
23. Zheng S., J. Shi, X. Wu, Z. Peng, C. Xin, L. Zhang, Y. Liu, M. Gao, S. Xu, H. Han, J. Yu, W. Sun, X. Cong, J. Li and J. Wang, 2018: Presence of Torque teno sus virus 1 and 2 in porcine circovirus 3-positive pigs. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 327-330.



# PARAMETRI ISTOLOGICI DI STIMA DELL'EFFICACIA DI VACCINI PCV2 A DIVERSO CONTENUTO DI ANTIGENE

## HISTOLOGICAL ASSESSMENT OF EFFECTIVENESS OF PCV2 VACCINES WITH DIFFERENT ANTIGEN PAYLOAD

SARLI G.<sup>1</sup>, D'ANNUNZIO G.<sup>1</sup>, GUARNERI F.<sup>2</sup>, BACCI B.<sup>1</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>2</sup>,  
BARBIERI I.<sup>2</sup>, LELLI D.<sup>2</sup>, TRESOLDI E.T.<sup>3</sup>, AMADORI M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> DIMEVET – Bologna University, Bologna, Italy

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italy

<sup>3</sup> DMV, Specialist in Science and Medicine of Laboratory Animals, Brescia, Italy.

**Parole chiave:** PCV2, vaccinazione, istologia.

**Key words:** PCV2, vaccination, histology.

### RIASSUNTO

L'istopatologia, strumento imprescindibile per la diagnosi di PCVD, mediante l'immunoistochimica è oggi anche un supporto per valutare la carica virale residua nei tessuti per stimare l'efficacia vaccinale. Obiettivo del presente studio è stata la stima, in soggetti vaccinati e poi esposti ad infezione nasale con PCV2, della presenza di lesioni riconducibili a PCVD nonché la stima della carica virale residua nei tessuti linfoidi. In nessuno dei 20 soggetti in esame sono state rilevate lesioni macroscopiche o microscopiche riferibili a PCVD: unica osservazione compatibile con infezione da PCV2 è stata il riscontro di cellule istiocitarie reattive e/o cellule giganti multinucleate singole centrofollicolari nel 31% dei tessuti linfoidi disponibili dai soggetti vaccinati, rispetto ad una percentuale del 13% nei soggetti non vaccinati. La carica virale residua saggiata mediante immunoistochimica è stata dimostrata solo in 3 soggetti su 20, con positività prevalentemente di grado 1. Conclusioni: 1) l'infezione sperimentale con PCV2 preceduta da vaccinazione non è risultata associata allo sviluppo di PCVD; 2) la carica virale residua nei tessuti linfoidi dopo esposizione a PCV2 è risultata bassa, ma il risultato andrebbe confrontato con metodica più sensibile dell'immunoistochimica; 3) emerge la possibile associazione ad un meccanismo IFN-gamma dipendente stimolato dal vaccino, nella presenza nei soggetti vaccinati di cellule giganti/istiocitarie reattive.

### ABSTRACT

Histopathology and immunohistochemistry have been confirmed as an essential tools in the diagnosis of Porcine Circovirus Diseases (PCVD), and are also helpful to evaluate the efficacy of PCV2-vaccines both in field conditions and in experimental vaccination challenges. The main goal of this study was to assess by histopathology and immunohistochemistry (IHC) the protective effect of an experimental PCV2-vaccine with different payload in vaccination-exposure challenge. Twenty pigs were examined. The only histological finding consistent with PCV2 infection was the presence of reactive histiocytic cells and/or centrofollicular single multinucleated giant cells. The percentage of these cells was higher in vaccinated (31%) than in the unvaccinated pigs (13%). Residual viral load assessed by IHC was demonstrated in 3/20 animals, which was predominantly grade 1. Conclusions: 1) experimental vaccination and infection with PCV2 was not associated with PCVD development; 2) residual viral load in lymphoid tissue after exposure to PCV2 is low, but the result should be compared with a more sensitive method; 3) the possible pathogenetic association between giant/histiocytic cells in lymphoid tissue and IFN-gamma-dependent mechanism in vaccinated subjects is hypothesized.

## INTRODUZIONE

Porcine Circovirus tipo 2 (PCV2) è oggi considerato uno degli agenti patogeni più importanti per i suini domestici in tutto il mondo; è responsabile di un ampio spettro di patologie indicate con l'acronimo PCVD – *Porcine Circovirus Disease* (Opriessnig *et al.*, 2007), di cui la più nota è la *Post-weaning multisystemic wasting syndrome* (PMWS).

La diminuzione della morbidità ed il miglioramento dell'efficienza produttiva dopo l'adozione dei vaccini anti-PCV2, introdotti in commercio nel 2004 in Europa e nel 2006 in America, hanno enfatizzato l'impatto negativo dell'infezione da PCV2. Infatti, oltre a ridurre la mortalità associata a PMWS, l'impiego della vaccinazione ha determinato un incremento della produttività sia nelle aziende colpite dalla PMWS che in quelle non colpite, in quest'ultimo caso rendendo evidente l'esistenza e l'importanza delle forme subcliniche d'infezione, che ugualmente determinano un impatto negativo sull'economia aziendale (Young *et al.*, 2011; Alacorn *et al.*, 2013). Nonostante i successi della vaccinazione, dimostratasi efficace nel ridurre i segni clinici di malattia, la carica virale nel sangue e la percentuale di suini viremici, nonché di determinare una diminuzione dell'escrezione virale, la maggior parte della popolazione suina è ancora cronicamente infetta da PCV2 (Afghah *et al.*, 2017). Infatti, i vaccini attualmente disponibili non inducono una protezione completa ed il virus continua a circolare anche nelle aziende che praticano la vaccinazione (Kekarainen & Segalés, 2015). In campo il problema principale rimane quello dell'insorgenza di infezioni subcliniche con ceppi naturalmente circolanti, che possono potenzialmente causare effetti collaterali, quali riduzione della risposta immunitaria sistemica, con ripercussioni sulla resistenza allo sviluppo di malattie.

Uno dei limiti dei vaccini commerciali può essere ascrivibile alla diversità genomica riscontrata nei ceppi di campo, che fanno ipotizzare la possibile fuga immunitaria da vaccino (Xiao *et al.*, 2012). Allo stesso modo, la diversità nella formulazione dei vaccini commerciali attualmente disponibili rende complessa la valutazione omogenea della loro efficacia, laddove si riscontrano differenze quantitative nell'induzione dell'immunità cellulo-mediata e umorale tra le diverse tipologie di vaccini monodose in commercio (Seo *et al.*, 2014), ed in virtù della mancanza di un dato di riferimento oggettivo riguardante la carica antigenica minima proteggente da fornire affinché siano raggiunti gli obiettivi della vaccinazione.

Vanno oggi dunque ampliandosi le frontiere nella sperimentazione di formulazioni vaccinali che possano garantire il conferimento di una maggiore protezione mediante lo sviluppo di una risposta immunitaria protettiva completa. In questo scenario di prospettive future nel campo della sperimentazione di nuove formulazioni vaccinali, la diagnostica istopatologica, che nel tempo si è confermata strumento diagnostico imprescindibile nelle diagnosi di PCVD, si colloca come supporto per stimare l'efficacia vaccinale sia in campo che in condizioni sperimentali di *challenge* vaccinazione-esposizione, tesa a dimostrare le basse cariche virali residue nei tessuti di soggetti vaccinati nel confronto con i non vaccinati, a conferma di un'avvenuta *clearance* virale.

Obiettivo del presente studio, di cui la parte in vivo ed i dosaggi di fattori umorali ematici è già stata presentata nel 2019 al convegno SIPAS (Guarneri *et al.*, 2019), è di documentare in soggetti vaccinati con una formulazione vaccinale sperimentale fornita a 3 diversi dosaggi, quale sia l'effetto protettivo verso l'infezione intranasale con PCV2 e quale sia, in seguito a quest'ultima, la carica residua virale nei tessuti target.

## MATERIALI E METODI

### Sperimentazione animale - Casistica

Sono stati utilizzati 20 suinetti ibridi commerciali "Goland" trattati nell'ambito di un programma sperimentale, autorizzato dal comitato etico di IZSLER e dal Ministero della Salute (autorizzazione MINSAL alla sperimentazione animale n. 230/2018 del 14/3/2018 ai sensi dell'art. 31 del D.lgs 26/2014). Brevemente: suinetti di 30 giorni di vita provenienti da 3



distinte nidiate, suddivisi in 4 gruppi, venivano stabulati in 4 diverse stalle d'isolamento. Dopo adeguato acclimatamento a 39 giorni sono stati vaccinati e, dopo 4 settimane, infettati per via intranasale (per dettagli Guarnieri *et al.*, 2019).

Il disegno sperimentale della vaccinazione ha previsto l'impiego di un vaccino sperimentale a diversa quantità di antigene costituito da un ceppo PCV2b intero inattivato con beta-propionolattone (BPL), formulato in adiuvante oleoso, somministrato per via IM nella regione del collo, a tre gruppi (A, B, C) di cinque animali ciascuno, in dose decrescente di antigene per ogni gruppo (A: 800 ng, B: 266 ng; C: 88 ng) e confrontato con un gruppo controllo non vaccinato (D). Dopo 4 settimane a tutti gli animali è stata somministrata, per via intranasale, una sospensione virale contenente 200.000 Dosi Infettanti 50% del ceppo PCV2 omologo a quello del vaccino.

### **Esame necroscopico e processazione dei campioni**

Gli animali sono stati soppressi a  $51 \pm 2$  giorni post-infezione e sottoposti ad esame necroscopico secondo protocollo autorizzato dal MINSAL in tre giornate, con identificazione random dei soggetti da sopprimere, in maniera da garantire la presenza di soggetti appartenenti a ciascun gruppo in ogni giornata di soppressione.

Durante l'esame necroscopico sono stati fissati in formalina tamponata campioni di tessuti prevalentemente linfoidi, notoriamente bersaglio di PCV2: linfonodo mesenterico, milza, linfonodo mediastinico, linfonodo inguinale superficiale, tonsille, ileo, polmone, trachea, bronchi a livello di biforcazione tracheale, cuore, fegato, rene e pancreas.

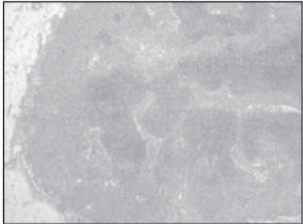
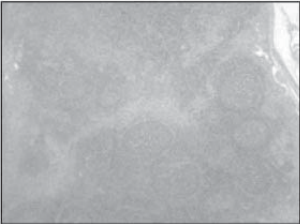
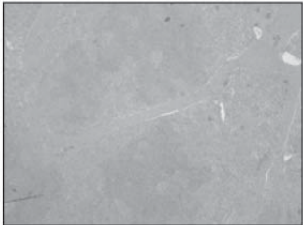
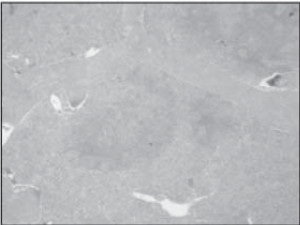
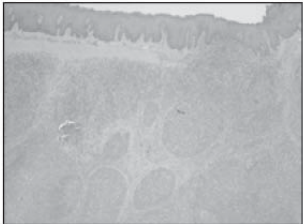
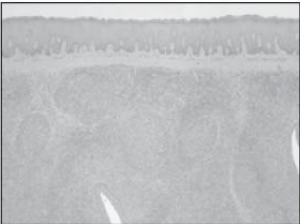
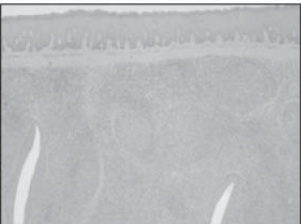
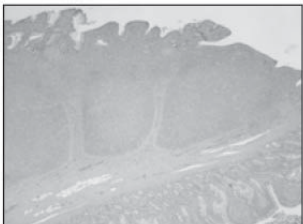
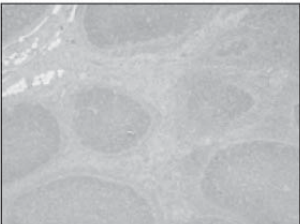
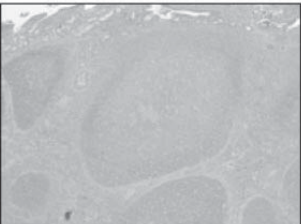
I tessuti fissati sono stati successivamente inclusi in paraffina e sono state ricavate sezioni di 4 mm di spessore, colorate in seguito con ematossilina-eosina ai fini delle indagini istologiche.

### **Graduazione**

E' stato applicato un sistema di graduazione atto a descrivere l'entità dell'iperplasia del tessuto linfoide (vedi figura 1) con le seguenti definizioni: Grado 1 o tessuto linfoide non reattivo: linfonodi (presenza di follicoli primari e tessuto medulla-like ben rappresentato), milza (presenza di guaine linfoidi periarteriolariformi formate unicamente da linfociti maturi con assenza di centri germinativi), tonsilla (presenza di tessuto linfoide diffuso senza centri germinativi), ileo (presenza di tessuto linfoide con assenza di centri germinativi). Grado 2: linfonodi (presenza di follicoli secondari in quasi tutto il tessuto linfoide ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare con riduzione percentuale della presenza di tessuto medulla-like, comunque sempre osservabile), milza (presenza di guaine linfoidi periarteriolariformi espanse, nel cui spessore è possibile apprezzare la presenza di centri germinativi), tonsilla e ileo (presenza di centri germinativi in non oltre il 50% del tessuto osservabile); Grado 3: linfonodi (marcata iperplasia reattiva di tutti i follicoli osservabili ed espansione del tessuto linfoide interfollicolare, che va ad occupare completamente, cancellandone l'osservazione, il tessuto medulla-like), milza (espansione pericentrica delle guaine linfoidi periarteriolariformi con presenza di numerosi centri germinativi e tendenza alla confluenza con i centri linfoidi adiacenti), tonsilla ed ileo (presenza di centri germinativi in tutto il tessuto linfoide osservabile).

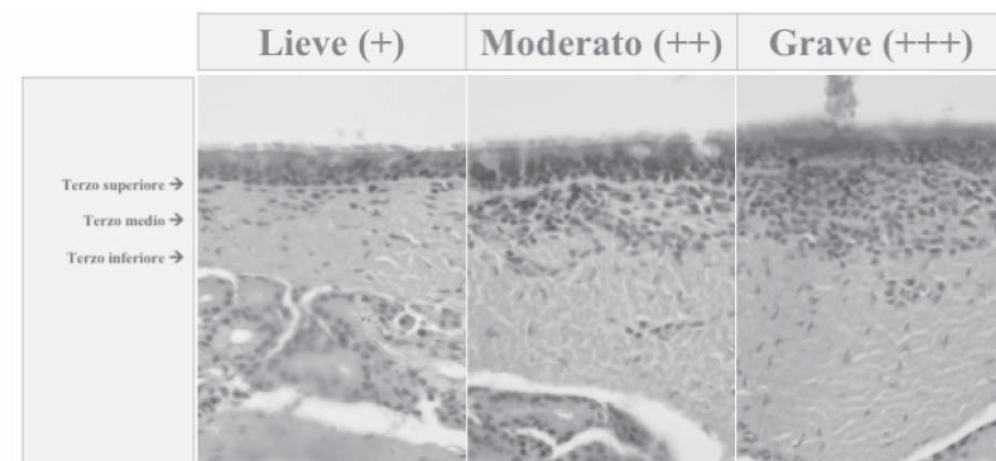
Poiché l'esposizione al virus è avvenuta per via nasale, si è concentrata l'attenzione su trachea e grossi bronchi a livello di biforcazione tracheale per individuare eventuali differenze di componente flogistica mucosale tra i gruppi a confronto, stimata mediante un sistema semiquantitativo di graduazione (esempio in figura 2). Il sistema ha previsto la valutazione dell'infiltrato infiammatorio e della sua estensione. Quest'ultima è stata stimata suddividendo idealmente lo strato della lamina propria *mucosae* in tre terzi: terzo superiore a contatto con l'epitelio cilindrico pseudostratificato ciliato della mucosa, terzo medio, e terzo inferiore a contatto con lo strato di cellule muscolari lisce. In ogni caso è stato stimato se l'infiltrato infiammatorio rimanesse localizzato nel terzo superiore o se si estendesse ad invadere gli altri

strati medio e inferiore. La valutazione semiquantitativa dell'entità della popolazione presente è stata considerata: lieve (+): quando in un campo a 40x si potevano osservare poche (da 5 a 10) cellule, tra linfociti e plasmacellule, disposte ad andamento lineare nella parte più superficiale del terzo superiore a contatto quasi con l'epitelio; moderata (++): quando il numero di cellule aumentava con tendenza ad occupare con distribuzione abluminale lo spazio disponibile; grave (+++): quando il numero delle cellule era così elevato da mascherare il tessuto connettivo della lamina propria. In tutta la circonferenza della trachea o dei bronchi sia l'intensità dell'infiltrato che l'estensione non apparivano uniformi e, il caso in corso di valutazione, è stato graduato in funzione della lesione peggiore osservabile anche se iporappresentata.

|           | Grado 1                                                                             | Grado 2                                                                             | Grado 3                                                                              |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| LINFONODO |    |    |    |
| MILZA     |    |    |    |
| TONSILLA  |  |  |  |
| ILEO      |  |  |  |

**Figura 1.** Quadro istologico del grado di iperplasia del tessuto linfoide nelle diverse stazioni linfoidi impiegate nello studio. Per tutte le sezioni colorazione ematossilina-eosina, obiettivo 5x.

**Figure 1.** Histological picture of tissue hyperplasia in the lymphoid organs used in the study. For the grading system see text. For all sections hematoxylin-eosin staining, 5x objective.



**Figura 2.** Graduazione dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria della trachea/bronco (biforcazione tracheale) confinata nel terzo superiore della lamina propria. Tutte le sezioni colorazione ematossilina-eosina, obiettivo 40x. Per il sistema di graduazione vedi testo. Da sinistra a destra +, ++, +++.

**Figure 2.** Grading of the inflammatory infiltrate in the lamina propria of the trachea / bronchus (tracheal bifurcation) confined in the upper third of the lamina propria. All sections hematoxylin-eosin staining, 40x objective. For the grading system see text. Left to right +, ++, +++.

### Metodica immunoistochimica

L'indagine immunoistochimica per PCV2, è stata condotta con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale specifico (Mab F217) gentilmente fornito dal Dr. Gordon Allan secondo procedura già pubblicata (Sarli *et al.*, 2009).

### Valutazione della reazione immunoistochimica per PCV2

Nei tessuti linfoidi la quantità di antigene virale, saggiata con indagine immunoistochimica, è stata stimata mediante una variazione dei criteri proposti da Opriessnig *et al.* (2010), prevedendo la possibilità di 4 differenti gradi di rilevazione dell'antigene:

Grado 0. assenza della reazione immunoistochimica;

Grado 1. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli inferiore al 25% dei follicoli presenti;

Grado 2. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti compreso tra il 25-50%;

Grado 3. positività anche di una sola cellula in un numero di follicoli presenti superiore al 50%.

### RISULTATI

In Tabella 1 sono riportati, suddivisi per gruppi, i risultati della graduazione dell'iperplasia dei tessuti linfoidi, le valutazioni del grado di infiltrazione mucosale nella trachea e nei grossi bronchi a livello della biforcazione tracheale ed i risultati della graduazione dell'indagine immunoistochimica.

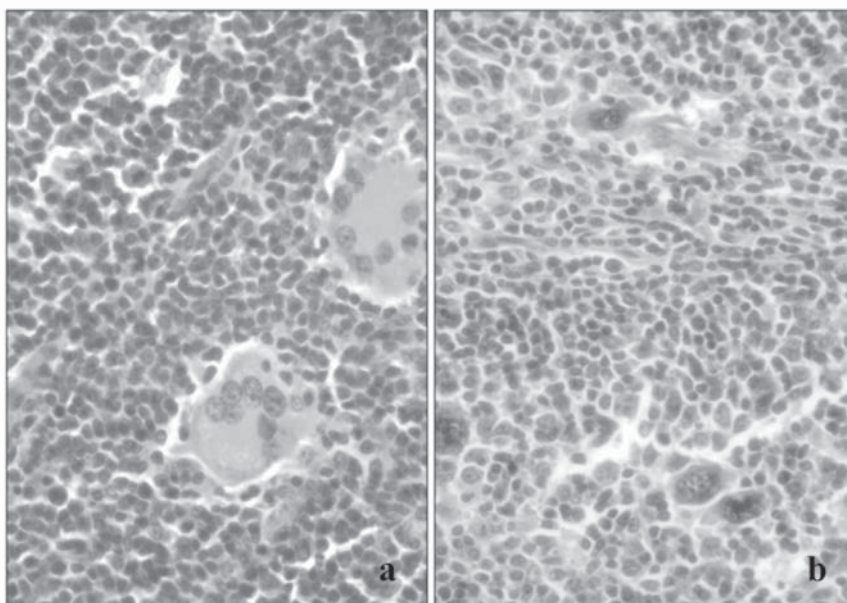
| Gruppi | Soggetto n. | LN<br>mesenterico | Milza | LN<br>mediastinico | LN<br>inguinale<br>sup. | Tonsille    | Ileo        | Trachea  | Bronco<br>dx | Bronco<br>sx |
|--------|-------------|-------------------|-------|--------------------|-------------------------|-------------|-------------|----------|--------------|--------------|
| A      | 15          | 3                 | 1     | 2                  | 1                       | 3<br>(CG/M) | 3<br>(CG/M) | *        | S +          | S +          |
|        | 5           | 3                 | 2     | 3                  | 1                       | 2<br>(CG/M) | 2           | S ++     | S ++         | S ++         |
|        | 17          | 3                 | 1     | 2                  | 1                       | 2           | 3<br>(CG/M) | *        | S e M<br>++  | S e M ++     |
|        | 18          | 3 (CG/M)          | 2     | 2 (CG/M)           | 2 (CG/M)                | 2<br>(CG/M) | *           | S e M ++ | S +          | S ++         |
|        | 14          | 2 (CG/M)          | 2     | 2 (CG/M)           | 2 (CG/M)                | 2<br>(CG/M) | 3<br>(CG/M) | S +      | S ++         | S ++         |
| B      | 10          | 3 (CG/M)          | 1     | 2                  | 1                       | 3           | 3           | *        | S +          | S +          |
|        | 13          | 3                 | 1     | 3                  | 2                       | 3           | 3<br>(CG/M) | S +      | S e M<br>++  | S +          |
|        | 19          | 3                 | 1     | 2 (CG/M)           | 1                       | 3           | 2           | S e M ++ | S ++         | S +          |
|        | 20          | 3                 | 2     | 2 (CG/M)           | 2                       | 2           | 2           | S ++     | *            | S ++         |
|        | 12          | *                 | 2     | 3 (CG/M)           | 2                       | 3<br>(CG/M) | *           | S ++     | S ++         | S +          |
| C      | 11          | 3                 | 2     | 1                  | 2                       | 3           | 3<br>(CG/M) | S e M ++ | S e M<br>++  | S e M ++     |
|        |             | IHC 1             | IHC 1 |                    | IHC 2                   |             |             |          |              |              |
|        | 16          | 3 (CG/M)          | 2     | 2 (CG/M)           | 2                       | 3<br>(CG/M) | 2<br>(CG/M) | S e M ++ | S +          | S +          |
|        |             | IHC 1             |       | IHC 1              |                         | IHC 1       | IHC 1       |          |              |              |
|        | 8           | 2                 | 1     | 2                  | 2                       | 3<br>(CG/M) | *           | S ++     | S ++         | S ++         |
| D      | 2           | 2                 | 2     | 2                  | 1                       | 3           | 2<br>(CG/M) | S +      | S +          | *            |
|        | 3           | 3 (CG/M)          | 2     | 2                  | 1                       | 3           | 3<br>(CG/M) | S +      | S ++         | S ++         |
|        |             | IHC 2             | IHC 1 | IHC 1              | IHC 1                   | IHC 1       |             |          |              |              |
|        | 4           | 3                 | 3     | 2                  | 3                       | 3           | 2           | S +      | S ++         | S ++         |
|        | 1           | 3                 | 2     | 3                  | 2                       | 3           | 3           | S ++     | S ++         | S ++         |
|        | 6           | 2                 | 2     | 2                  | 2                       | 3           | 2<br>(CG/M) | S ++     | S ++         | *            |

**Tabella 1.** Risultati della graduazione istologica dell'iperplasia nelle diverse stazioni linfoidi, della localizzazione e dell'entità dell'infiltrato infiammatorio nella lamina propria della trachea e dei grossi bronchi a livello di biforcazione tracheale e della reazione IHC per la graduazione della carica virale residua nei tessuti linfoidi. I risultati dell'indagine IHC sono riportati solo se diversi da 0. CG/M = stazione linfoide con presenza di isolate cellule giganti e/o multinucleate centrofollicolari. \* = sezione mancante. S = terzo superiore; M = terzo medio.

**Table 1.** Results of the histological grading of lymphoid tissues hyperplasia, localization and extent of the inflammatory infiltrate in the lamina propria of the trachea and of the large bronchi at the level of the tracheal bifurcation and of the IHC reaction for the grading of the residual viral load in lymphoid tissues. The results of IHC are reported only if different from 0. CG / M = presence of isolated giant cells and / or centrofollicular multinucleated cells. \* = section missing. S = upper third; M = middle third.

Dall'esame dei risultati riportati in tabella 1, non si evincono differenze sostanziali tra i diversi gruppi nel grado di iperplasia dei tessuti linfoidei. Risulta evidente in tutti i soggetti la scarsa risposta iperplastica splenica che, solo nel gruppo D (soggetti di controllo non vaccinati), appare leggermente più pronunciata. In tutti i gruppi si può inoltre notare una scarsa risposta reattiva del linfonodo inguinale superficiale. Più elevata iperplasia è stata invece riscontrata in tonsille, linfonodi mesenterici e tessuto linfoide dell'ileo. Per quanto riguarda i linfonodi tracheo-bronchiali (tributari del territorio di esposizione al virus), la reazione iperplastica si è dimostrata essere di grado intermedio, sicuramente non elevata come quella dei linfonodi mesenterici.

In nessuno dei 20 soggetti in sperimentazione sono state rilevate lesioni macro- o microscopiche riferibili a PCVD. L'unica osservazione istologica compatibile con un effetto citopatico legato all'infezione da PCV2 è stata il riscontro di occasionali cellule istiocitarie reattive e/o cellule giganti multinucleate singole, localizzate al centro dei follicoli (Figura 3), senza mai riscontrare una chiara connotazione di granuloma. In ogni soggetto erano disponibili 6 stazioni linfoidei; nei 5 soggetti del gruppo non vaccinato (D), su 30 stazioni linfoidei totali sono state osservate cellule istiocitarie reattive e/o giganti centrofollicolari in 4 tessuti appartenenti a 3 soggetti diversi. Mentre complessivamente nei 15 soggetti dei 3 gruppi sottoposti a vaccinazione sono state riscontrate cellule istiocitarie reattive e/o giganti in 28 stazioni di tessuto linfoide su 90, appartenente ad ognuno dei 15 soggetti (vedi Tabella 1). Complessivamente la percentuale di cellule istiocitarie reattive e/o giganti centrofollicolari è risultata più elevata nei soggetti vaccinati (31%) rispetto ai soggetti non vaccinati (13%), ma il test Chi quadrato ha evidenziato una differenza al limite della significatività ( $P=0,056$ ) nel confronto tra le due percentuali.



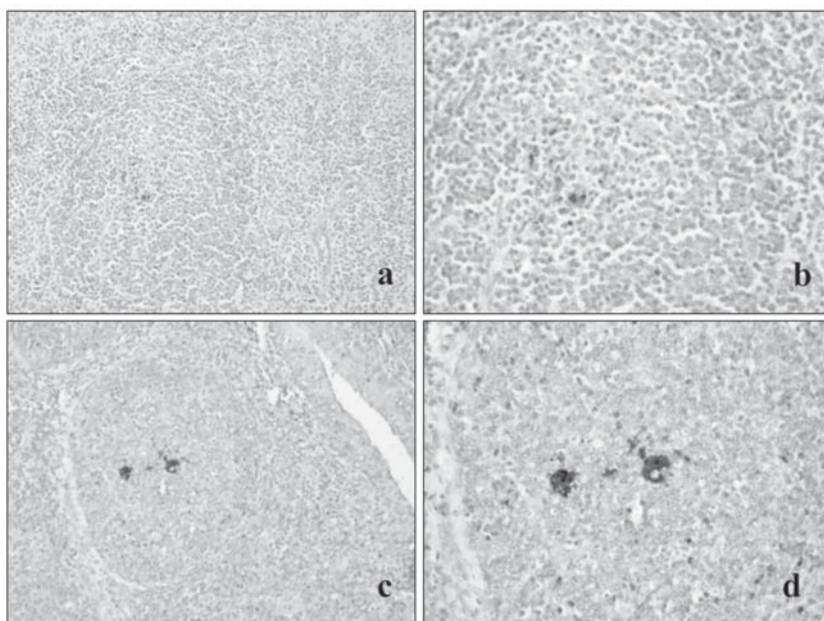
**Figura 3.** a) Suino, soggetto gruppo D (soggetto n. 6), ileo, cellule multinucleate nel tessuto linfoide. b) Suino, soggetto gruppo C (soggetto n. 16), ileo, cellule istiocitarie reattive nel tessuto linfoide. Ematossilina-eosina, 40x.

**Figure 3.** a) Pig, group D subject 6, ileus, multinucleated cells in lymphoid tissue. b) Pig, group C subject 16, ileum, reactive histiocytic cells in lymphoid tissue. Hematoxylin-eosin, 40x.



L'infiltrato infiammatorio mucosale a livello di trachea e grossi bronchi, in tutti i gruppi, si è dimostrato essere prevalentemente rappresentato da una lieve (+) o moderata (++) quantità di linfociti e plasmacellule localizzata nel terzo superiore della lamina propria; lo sconfinamento di una moderata quantità di infiltrato infiammatorio a livello di terzo medio è stato evidenziato saltuariamente (1 soggetto per gruppo), nell'ambito dei gruppi sottoposti a vaccinazione.

Con l'indagine immunoistochimica la reazione positiva per PCV2 si è evidenziata con colorazione marrone del citoplasma (figura 4), complessivamente con positività, se presente, riconducibile prevalentemente al grado 1; solo in due stazioni linfonodali (soggetti 3 e 11) si è riscontrata una quantità di antigene di grado 2. Nel complesso la carica virale residua è stata dimostrata solo in 3 soggetti su 20 sottoposti ad indagine immunoistochimica (vedi tabella 1).



**Figura 4** Risultato della reazione IHC per la quantificazione dell'antigene virale in un suino del gruppo D (soggetto n. 3); a) linfonodo inguinale superficiale, follicolo positivo, 20x; in b) a 40x, particolare della positività all'IHC nel follicolo linfonodale; c) tonsilla, follicolo positivo, 20x; in d) a 40x, particolare della positività nella tonsilla, rappresentata da 2 cellule giganti positive alla reazione IHC.

**Figure 4** IHC reaction for the quantification of the viral load. Group D, subject 3; a) superficial inguinal lymph node and c) tonsils showing positive cells in a follicle, 20x; in b) and d) details at higher magnification respectively of a) and c) (40x).

## DISCUSSIONE

Dai risultati presentati al Meeting annuale SIPAS del 2019 (Guarneri *et al.*, 2019) relativi all'indagine in vivo è emerso che lo sviluppo di risposta IFN-g è un rilievo altamente predittivo di protezione: la risposta IFN-g viene modulata in senso positivo dal vaccino inattivato e non dal virus infettante. Infatti, i soggetti che hanno sviluppato tale risposta PCV2-specifica dopo la vaccinazione, non hanno presentato viremia post-infezione. Inoltre, la quantità di antigene presente nel vaccino influisce sui livelli di anticorpi neutralizzanti anche nel periodo post-

infezione. Tutti i soggetti del gruppo di controllo non vaccinato (D), non hanno mostrato lo sviluppo di risposta IFN-g successivamente all'infezione intranasale con PCV-2. In tale gruppo, la viremia è stata riscontrata in tutti i soggetti; in generale, tutti i soggetti risultati viremici dopo l'esposizione al virus erano IFN-g negativi e con titolo anticorpale inferiore o uguale a 1:100 a tre settimane dalla vaccinazione, a testimonianza di una stimolazione non efficace del sistema immunitario. Il titolo anticorpale non è risultato un adeguato indicatore di protezione a livello individuale, dal momento che il picco anticorpale è risultato talora coincidere con il picco della viremia; tuttavia è risultata esserci una correlazione positiva tra dosaggio antigenico nel vaccino ed entità dei titoli di anticorpi, considerando che il gruppo A ha sviluppato un titolo medio significativamente maggiore. Sull'efficacia virologica del vaccino risulta essere quindi predittivo lo sviluppo di una risposta IFN-g-mediata più che lo sviluppo della risposta umorale (Guarneri *et al.*, 2019).

In sede di confronto dei risultati ottenuti dalle diverse pertinenze laboratoristiche coinvolte nel progetto, siamo stati chiamati, con i risultati ottenuti presso il Servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET, a rispondere alle seguenti domande.

### **1. Complessivamente si può sostenere che in seguito ad esposizione a PCV2 nei soggetti vaccinati non si sono rilevate lesioni riferibili a PCVD?**

Il risultato si può considerare atteso, visto che la riproduzione sperimentale delle PCVD prevede sempre, oltre all'infezione con PCV2, anche la co-presenza di uno stressore infettivo o non infettivo che in questo caso non è stato fornito, poiché l'obiettivo del progetto era solo valutare la risposta al vaccino ed il contenimento della viremia dopo esposizione.

Unica manifestazione istologica del possibile danno da PCV2 è stata identificata nella presenza di cellule istiocitarie reattive/giganti centrofollicolari, senza che queste abbiano mai assunto una chiara connotazione di granuloma.

Si ritiene che in molti granulomi cosiddetti "infettivi" la formazione di cellule epiteliodi/giganti multinucleate a partire dai macrofagi faccia seguito all'attivazione degli stessi da parte di citochine liberate da linfociti attivati dal contatto con gli antigeni, come nel caso della formazione dei granulomi tubercolari, che si sviluppano attraverso una risposta linfocitaria di tipo Th1 (Ackermann, 2017). Tra le diverse citochine capaci di attivare i macrofagi nel processo che porta alla formazione di cellule giganti multinucleate, risultanti dalla fusione di due o più macrofagi attivati, risulta essere coinvolto anche l'IFN-g (Snyder, 2017), e nei soggetti vaccinati se ne è riscontrata una produzione antigene-specifica sia come risposta al vaccino che nella successiva infezione sperimentale.

Se si confrontano le percentuali di tessuti linfoidi che hanno manifestato la presenza di cellule istiocitarie reattive/giganti centrofollicolari, complessivamente i tre gruppi di soggetti vaccinati hanno presentato una percentuale di coinvolgimento maggiore (31%) rispetto a quelli non vaccinati (13%), lasciando ipotizzare l'importanza di questo meccanismo IFNg-dipendente; pur consapevoli che il test statistico ha messo in evidenza una differenza al limite della significatività tra i valori a confronto ( $P=0,056$ ), la conferma potrebbe essere ottenuta utilizzando un maggior numero di soggetti. L'ipotesi di un meccanismo legato all'ipersensibilità ritardata nella genesi della formazione di queste varianti cellulari centrofollicolari andrebbe anche contestualizzato, considerando che anche il coinvolgimento di altre citochine può contribuire al risultato, interferendo in maniera sinergica o antagonista con l'IFN-g.

### **2. La vaccinazione ha realmente ridotto la carica virale nei tessuti target?**

La diminuzione della comparsa di PCVD è stato uno dei successi maggiori conseguiti con l'avvento della vaccinazione, mentre non completamente conclusi sono i risultati sulla reale riduzione dei soggetti con infezione subclinica.



Da diversi anni sono noti criteri per stimare la carica virale per PCV2 nei tessuti anche in seguito a vaccinazione (Opriessnig *et al.*, 2010; Hemann *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013). I criteri impiegati per stimare l'efficacia vaccinale sono gli stessi utilizzati per la diagnosi di PMWS, ma con logicità contraria: assenza di segni clinici di malattia, riduzione della carica virale nel siero indicante efficacia virologica, assenza di lesioni caratteristiche nei tessuti linfoidi e assenza di rilevazione mediante tecniche di immunoistochimica e ibridazione *in situ* dell'antigene virale a livello di stazioni linfoidi; a questi rilievi si aggiunge la stima dell'efficacia immunologica conferita dalla vaccinazione mediante valutazione della risposta umorale e cellulo-mediata (Chae, 2012).

Nella casistica oggetto di questo studio l'applicazione di metodica immunoistochimica per stimare la presenza di macrofagi contenenti antigeni virali ha messo in evidenza una bassa percentuale di soggetti positivi: 3 soggetti su 20, di cui 2 del gruppo a basso dosaggio di antigene virale vaccinale (gruppo C) e 1 del gruppo di controllo (D) non vaccinato. Il risultato va analizzato in maniera critica. Se da un lato può essere considerato positivamente, in quanto la riduzione della quantità di virus a livello di tessuti target è uno degli obiettivi della vaccinazione, dall'altro il risultato può essere la conseguenza delle condizioni sperimentali. Le PCVD sono sindromi multifattoriali innescate dalla presenza di cofattori infettivi e ambientali; la stessa gestione in termini di biosicurezza, igiene e management d'allevamento si è dimostrata poter influire sulla progressione dell'infezione da PCV2 (Madec *et al.*, 2008; Andraud *et al.*, 2009). Ne deriva che le condizioni di esperimento, con stabulazione degli animali in ambiente controllato ad elevata biosicurezza, in presenza di parametri ambientali ottimali, e che hanno diminuito o meglio tenuto sotto controllo la co-presenza di stressori microbiologici, ha di fatto ridotto la possibilità di raggiungere elevati tassi di replicazione del PCV2 che, come è noto, è favorito dalla presenza di attivatori dei macrofagi. Quindi già questa considerazione può giustificare la bassa carica virale riscontrata complessivamente a livello di tessuti nei soggetti in sperimentazione.

Gli unici 3 soggetti risultati positivi per PCV2 all'IHC a livello di tessuti linfoidi (vedi Tabella 1), hanno presentato una viremia più tardiva (al, o fino, al 35° giorno p.i.), mentre in tutti gli altri soggetti o la viremia non si è mai manifestata oppure si è risolta più precocemente e, quindi, temporalmente è risultata molto più distante dalla data di soppressione. Questo potrebbe giustificare l'assenza di antigene determinabile nei tessuti target riscontrata negli animali del presente studio. Inoltre nei 3 soggetti risultati con carica virale determinabile, è opportuno sottolineare la scarsa quantità riscontrata (prevalentemente con carica virale residua di grado 1). Va comunque considerato che pur con reazione IHC negativa, non si può concludere sulla reale negatività dei soggetti risultati tali, considerando la minore sensibilità della tecnica IHC rispetto ad altre più sensibili (es. PCR). Quindi una bassa carica virale di partenza abbinata ad un tempo di prelievo dei tessuti (soppressione) distante dall'ultima viremia, può aver contribuito al risultato ottenuto, che necessita di una verifica nelle condizioni di campo, molto diverse da quelle sperimentali soprattutto per la co-presenza di diversi co-stressori microbiologici.

## CONCLUSIONI

In accordo con le attese, l'infezione sperimentale con solo PCV2 non è risultata associata allo sviluppo di PCVD nei 15 soggetti vaccinati in esame e in quelli del gruppo di controllo.

La carica virale residua nei tessuti linfoidi dopo esposizione a PCV2 è risultata bassa, ma il risultato andrebbe confrontato con metodica più sensibile (PCR), o programmando le soppressioni in tempi più vicini all'ultimo episodio viremico.

Resta da confermare, alla luce di una maggiore casistica, se la presenza di cellule giganti multinucleate e istiocitarie reattive, maggiormente presenti nel gruppo di soggetti vaccinati, possa essere riconducibile ad un meccanismo immunoreattivo IFNg-dipendente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Ackermann M. R. (2017) "Inflammation and Healing". In: Zachary, J. F., "Pathologic basis of veterinary disease" 6<sup>th</sup> Ed., St. Louis - Missouri, Elsevier, 72-131.
2. Afghah Z., Webb B., Meng X. J., & Ramamoorthy S. (2017) "Ten years of PCV2 vaccines and vaccination: is eradication a possibility?" *Vet. Microbiol.* 206, 21-28.
3. Alarcon P., Rushton J., Nathues H., & Wieland B. (2013) "Economic efficiency analysis of different strategies to control post-weaning multi-systemic wasting syndrome and porcine circovirus type 2 subclinical infection in 3-weekly batch system farms". *Prev. Vet. Med.* 110(2), 103-118.
4. Andraud M., Rose N., Grasland B., Pierre J. S., Jestin A., & Madec F. (2009) "Influence of husbandry and control measures on porcine circovirus type 2 (PCV-2) dynamics within a farrow-to-finish pig farm: a modelling approach". *Prev. Vet. Med.* 92(1-2), 38-51.
5. Chae C. (2012) "Commercial porcine circovirus type 2 vaccines: Efficacy and clinical application". *Vet. J.* 194(2), 151-157.
6. Guarneri F., Amadori M., Boniotti M. B., Barbieri I., Lelli D., & Tresoldi E. (2019) "Parametri di immunità protettiva nel suino indotti da vaccini PCV2 a diverso contenuto di antigene". In: "Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini XLV Meeting Annuale", Rezzato (BS) - Villa Fenaroli - 21/22 Marzo 2019, 161-170.
7. Hemann M., Beach N. M., Meng X. J., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Vaccination with inactivated or live-attenuated chimeric PCV1-2 results in decreased viremia in challenge-exposed pigs and may reduce transmission of PCV2". *Vet. Microbiol.* 158(1-2), 180-186.
8. Kekarainen T., & Segalés J. (2015) "Porcine circovirus 2 immunology and viral evolution". *Porcine Health Manag.* 1(1), 17.
9. Madec F., Rose N., Grasland B., Cariolet R., & Jestin A. (2008) "Post-weaning multisystemic wasting syndrome and other PCV2-related problems in pigs: a 12-year experience". *Transbound. Emerg. Dis.* 55(7), 273-283.
10. Opriessnig T., Meng X. J., & Halbur P. G. (2007) "Porcine circovirus type 2-associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies". *J. Vet. Diagn. Invest.* 19(6), 591-615.
11. Opriessnig T., Patterson A. R., Madson D. M., Pal N., Ramamoorthy S., Meng X. J., & Halbur P. G. (2010) "Comparison of the effectiveness of passive (dam) versus active (piglet) immunization against porcine circovirus type 2 (PCV2) and impact of passively derived PCV2 vaccine-induced immunity on vaccination". *Vet. Microbiol.* 142(3-4), 177-183.
12. Park C., Oh Y., Seo H. W., Han K., & Chae C. (2013) "Comparative effects of vaccination against porcine circovirus type 2 (PCV2) and porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in a PCV2-PRRSV challenge model". *Clin. Vaccine Immunol.* 20(3), 369-376.
13. 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 PMWS in Italy". *Veterinary Record*, 164, 519-523, 2009.
14. Seo H. W., Lee J., Han K., Park C., & Chae C. (2014) "Comparative analyses of humoral and cell-mediated immune responses upon vaccination with different commercially available single-dose porcine circovirus type 2 vaccines". *Res. Vet. Sci.* 97(1), 38-42.

15. Shen H. G., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Prevalence and phylogenetic analysis of the current porcine circovirus 2 genotypes after implementation of widespread vaccination programmes in the USA". *J. Gen. Virol.* 93(6), 1345-1355.
16. Snyder P. W. (2017) "Diseases of Immunity". In: Zachary, J. F., "Pathologic basis of veterinary disease" 6<sup>th</sup> Ed., St. Louis, Missouri, Elsevier, 242-285.
17. Xiao C. T., Halbur P. G., & Opriessnig T. (2012) "Complete genome sequence of a novel porcine circovirus type 2b variant present in cases of vaccine failures in the United States". *J. Virol.* 86, 12469.
18. Young M. G., Cunningham G. L., & Sanford S. E. (2011) "Circovirus vaccination in pigs with subclinical porcine circovirus type 2 infection complicated by ileitis". *JSHAP*, 19(3), 175-180.

# **I NUOVI CEPPI ISOLATI DI VIRUS PRRS IN ALLEVAMENTO: COME RICONOSCERE LA LORO POSSIBILE VIRULENZA?**

## **NEW PRRS VIRUS STRAINS IN PIG FARMS: HOW TO IDENTIFY THEIR POSSIBLE VIRULENCE?**

TONNI M., FERLAZZO G., RUGGERI J., GUARNERI F., ALBORALI G.L.,  
BONIOTTI M.B., AMADORI M.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia*

**Parole chiave:** PRRSV, patogenicità

**Key words:** PRRSV, pathogenicity

### **RIASSUNTO**

Il confronto tra diversi isolati di virus PRRS (PRRSV) ad oggi viene realizzato mediante il sequenziamento di alcune aree genomiche, che forniscono però limitate informazioni riguardo alla loro patogenicità. Obiettivo di questo lavoro è stato quello di classificare alcuni isolati di PRRSV sulla base della risposta immunitaria innata indotta *in vitro*. Dieci isolati di campo e due di riferimento (attenuato e ad alta patogenicità) sono stati coltivati *in vitro* e ne è stata poi testata l'interazione con cellule mononucleate di sangue periferico di suini SPF. Il pattern di citochine prodotte ha permesso di differenziare l'isolato attenuato da quelli patogeni. In particolare, l'isolato attenuato è stato l'unico a stimolare il rilascio di IL-1 $\beta$ , mediatore dell'immunità innata, prodotta dalla Caspasi-1 intracitoplasmatica. Questo comportamento delinea la capacità dei ceppi patogeni di evadere la risposta del sistema immunitario innato, che invece manca in quelli attenuati. Quanto rilevato ci suggerisce che è possibile una classificazione in "immunotipi" degli isolati di PRRSV e che questo approccio potrebbe avere un risvolto pratico nel confronto tra vecchi e nuovi isolati all'interno di un allevamento.

### **ABSTRACT**

The comparison among different PRRSV strains is mainly performed nowadays by genome sequencing with little or no information regarding virulence. Aim of this study was the classification of some strains of PRRS virus based on the *in vitro* innate immune response. Ten field strains and two reference strains (attenuated and pathogenic) were propagated *in vitro* and later tested on PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) from SPF pigs. The cytokine response pattern allowed us to differentiate the attenuated strain from the pathogenic ones. The attenuated strain was the only one inducing an IL-1 $\beta$  response, sustained by intracellular Caspase-1. This model highlights the ability of PRRSV pathogenic strains to evade the innate immune system, as opposed to the attenuated ones. Our results suggest a possible "immunotypes" classification of PRRSV strains, toward a meaningful comparison among strains isolated in pig farms.

### **INTRODUZIONE**

La sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è causata da un virus RNA a catena positiva della famiglia degli Arteriviridae (PRRSV) e ad oggi è ancora ampiamente diffusa negli allevamenti italiani. L'impatto economico della malattia è proporzionale alle manifestazioni cliniche che provoca (Neumann et al., 2005), a loro volta influenzate oltre che dall'isolato virale anche dall'ospite che viene infettato (Petry et al., 2005) e

dall'ambiente di allevamento (Corzo et al., 2010). Ad oggi la caratterizzazione di un isolato virale viene realizzata mediante il sequenziamento di alcune aree del genoma (Li et al., 2012) #c , che consente il confronto di isolati diversi in base all'omologia di sequenza (Kappes and Faaberg, 2015). Infatti è stato rilevato che due isolati possono ragionevolmente essere considerati diversi se l'omologia è inferiore al 97% (Murtaugh, 2012), senza però fornire informazioni riguardo alle caratteristiche di possibile virulenza . Inoltre questo tipo di approccio non spiega la complessa relazione che esiste tra virus e ospite (Yoo et al., 2010), regolata da molte più aree genomiche di quelle solitamente sequenziate (ORF 5 e ORF 7). A questo proposito, grazie a studi *in vitro* è stata ipotizzata la presenza di “immunotipi” (Gimeno et al., 2011), ossia isolati virali con un diverso pattern di reazione nei confronti del sistema immunitario innato e quindi con una probabile ripercussione sulla virulenza osservabile *in vivo*.

Obiettivo di questo lavoro è stato elaborare una valutazione *in vitro* di alcuni isolati virali, basata sulle citochine prodotte delle cellule dell'immunità innata in risposta al virus.

## MATERIALI E METODI

### Disegno sperimentale

In questo studio sono stati presi in considerazione dieci isolati del virus della PRRS derivanti da sette allevamenti in cui è stata osservata la patologia con diverse forme cliniche (Tabella 1) ed in cui la presenza del virus è stata accertata mediante l'analisi biomolecolare su sangue o omogenato ottenuto da organi di animali deceduti. Inoltre, sono stati presi in considerazione due isolati definiti BS773 e BS114, rispettivamente ad alta patogenicità e attenuato, validati con una precedente prova sperimentale *in vivo*. Tutti gli isolati virali sono stati coltivati su macrofagi alveolari polmonari o derivanti da monociti e successivamente incubati su un substrato di cellule mononucleate di sangue periferico di suini SPF. La risposta immunitaria è stata quindi valutata tramite la misurazione delle citochine di interesse prodotte nel substrato coltivato

**Tabella 1.** Identificazione degli isolati virali con i relativi dati anamnestici e clinici. In tre casi dallo stesso focolaio sono stati identificati due isolati diversi (1,2 e 6).

**Table 1.** Virus strains identification with anamnestic and clinical data. Three strains were isolated from the same outbreak (1,2 and 6).

| Identificazione dell'isolato | Data di isolamento | Materiale da cui è stato isolato | Forma clinica osservata     |
|------------------------------|--------------------|----------------------------------|-----------------------------|
| 1 (a-b)                      | Dicembre 2016      | Sangue                           | Riproduttiva                |
| 2 (a-b)                      | Dicembre 2016      | Sangue                           | Respiratoria                |
| 3                            | Gennaio 2017       | Sangue                           | Riproduttiva                |
| 4                            | Gennaio 2017       | Omogenato organo                 | Riproduttiva e respiratoria |
| 5                            | Gennaio 2017       | Omogenato organo                 | Riproduttiva e respiratoria |
| 6 (a-b)                      | Maggio 2017        | Omogenato organo                 | Riproduttiva                |
| 7                            | Giugno 2017        | Omogenato organo                 | Riproduttiva                |

### **Analisi di laboratorio**

La presenza del virus della PRRS negli allevamenti selezionati è stata accertata mediante analisi biomolecolare. Dai campioni di sangue o di omogenato di organo degli animali deceduti è stato estratto l'RNA mediante l'utilizzo del kit NucleoMag® Vet kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) tramite estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni del produttore. La successiva reazione di RT-PCR Real-Time è stata invece realizzata mediante il kit LSI VetMAX (TM) PRRSV EU/NA Real-Time PCR kit (Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) con relative istruzioni operative.

Ogni isolato è stato risospeso in terreno RPMI 1640 + 2% siero fetale bovino (SFB) e filtrato attraverso una micro-membrana da 0,2 micron. Successivamente 0,2 ml di materiale sono stati adsorbiti su una coltura di macrofagi alveolari polmonari o da monociti ematici, precedentemente ottenuta da suini SPF (specific pathogen free), PRRS-naïve, e incubati a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub>. La coltura è stata osservata per i tre giorni successivi valutandone l'effetto citopatico.

Il virus ottenuto è stato poi quantificato mediante RT-PCR Real-Time. Mediante diluizioni seriali di uno standard EU PRRSV RNA ( $3.5 \times 10^5$  - 35 copie/ $\mu$ L) è stata allestita una curva standard per quantificare RNA di PRRSV. Ciascun ceppo è stato poi testato su colture di cellule mononucleate di sangue periferico a molteplicità 2 (2 copie genomiche / cellula) anche in questo caso prelevate da suini SPF e PRRS-naïve con l'aggiunta di una soluzione antibiotata e incubate a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> per 18 ore. La misurazione delle citochine di interesse è stata realizzata con i seguenti kit commerciali: TNF-alfa (Pierce Endogen, Rockford, USA), IL-1beta (Porcine IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, R&D Systems, cat. DY681), IL-10 (Porcine IL-10 DuoSet ELISA, R&D Systems, cat. DY693B) ed IL-8 (R&D systems, DUOset cat. DY535) seguendo le istruzioni del produttore. È stata inoltre valutata la Caspasi-1 intra-citoplasmatica con un kit colorimetrico (BioVision, Catalog #K111-200). Per tutte queste componenti, è stato calcolato il rapporto di espressione rispetto al livello basale (senza lo stimolo di PRRSV).

Successivamente, per alcuni isolati è stata valutata la risposta immunitaria innata in una condizione infiammatoria, indotta artificialmente con l'aggiunta di LPS (1  $\mu$ g/ml) nella coltura cellulare. In tal caso, le cellule sono state analizzate tramite citometria a flusso (Guava easyCyte HT flow cytometer e relativo software Incyte) per valutare l'espressione della caspasi-1 intracellulare.

### **Analisi statistica**

La frequenza di positività ad ogni test è stata analizzata mediante test del Chi-quadrato e la significatività statistica fissata a  $p < 0,05$  (Graph Pad Prism 5, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA).

### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

La replicazione dei dieci isolati di PRRSV è stata elevata sia nelle colture di macrofagi alveolari polmonari che sui macrofagi da monociti di sangue periferico. Il test di stimolazione effettuato su 4-6 colture cellulari differenti per ogni isolato virale ha mostrato risultati diversi tra loro ( $p < 0,01$ ) per quanto riguarda caspasi-1, TNF-alfa e IL-10 mentre si è notata una tendenza comune ad indurre il rilascio di IL-8 (Tabella 2).



**Tabella 2.** Valutazione della risposta immunitaria innata in colture di macrofagi di sangue periferico esposti a diversi isolati di PRRSV. In tabella è riportato l'induzione (+) oppure la mancanza (-) del rilascio di citochine.

**Table 2.** Evaluation of innate immune response in PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) cultures with different PRRSV strains. The induced (+) or missing (-) cytokines are shown in the table.

| Isolato di PRRSV | Citochine rilevate |           |           |       |
|------------------|--------------------|-----------|-----------|-------|
|                  | IL-8               | Caspasi-1 | TNF-alpha | IL-10 |
| 1-a              | +                  | -         | +         | +     |
| 1-b              | +                  | +         | -         | -     |
| 2-a              | +                  | -         | -         | +     |
| 2-b              | +                  | -         | +         | -     |
| 3                | -                  | -         | +         | +     |
| 4                | +                  | -         | +         | -     |
| 5                | +                  | -         | -         | -     |
| 6-a              | -                  | +         | +         | -     |
| 6-b              | +                  | -         | -         | -     |
| 7                | +                  | +         | -         | -     |

I pattern maggiormente rilevati sono stati quelli corrispondenti agli isolati 1a, 2a, 2b e 5 che successivamente sono stati confrontati con quelli dei due isolati di riferimento. In questo caso l'analisi è stata ancora più approfondita includendo la rilevazione di IL-1beta. Come mostrato in Tabella 3, gli isolati di riferimento mostrano un profilo di risposta immunitaria paragonabile a quello degli isolati di campo, ma con alcune sostanziali differenze. Il rilascio di IL-1beta è evidente solo nell'isolato BS114 (attenuato) mentre l'isolato BS773 (ad alta patogenicità) non stimola alcun tipo di produzione citochinica.

Sulla base dei dati precedenti gli stessi isolati di PRRSV sono stati testati *in vitro* anche all'interno di una condizione infiammatoria. In tali condizioni radicalmente diverse, il profilo di risposta si modifica nettamente. Saggiato mediante saggio citometrico, il ceppo attenuato BS114 provocava il maggiore incremento (in presenza di LPS) di leucociti vivi, positivi per caspase-1, come pure il maggiore contenimento dei fenomeni di apoptosi/necrosi. Ma soprattutto, il ceppo attenuato induceva una forte riduzione della risposta IL-1 beta, a differenza invece dei ceppi patogeni.

**Tabella 3.** Confronto della risposta immunitaria innata tra quattro isolati di campo di PRRSV e due isolati di riferimento (saggiati in vivo). In tabella è riportata l'induzione (+) oppure la mancanza (-) del rilascio di citochine.

**Table 3.** Comparison of innate immune response between four field PRRSV strains and two reference PRRSV strains (validated in vivo). The induced (+) or missing (-) cytokines are shown in the table.

| Isolato di PRRSV | Citochine rilevate |           |           |       |          |
|------------------|--------------------|-----------|-----------|-------|----------|
|                  | IL-8               | Caspase-1 | TNF-alpha | IL-10 | IL-1beta |
| 1-b              | +                  | +         | -         | -     | -        |
| 2-a              | +                  | -         | -         | +     | -        |
| 2-b              | +                  | -         | +         | -     | -        |
| 5                | +                  | -         | -         | -     | -        |
| BS773            | -                  | -         | -         | -     | -        |
| BS114            | +                  | -         | -         | -     | ++       |

I risultati di questo studio confermano quindi che la risposta immunitaria innata a PRRSV varia a seconda del tipo di isolato virale e dell'ospite infettato, come riportato da Gimeno e colleghi (Gimeno et al., 2011). Infatti, oltre agli isolati virali, aventi una differente provenienza, anche i macrofagi sono stati ottenuti da suini diversi (seppur tutti SPF e PRRS-naïve), quindi con una certa variabilità individuale. Ciononostante, è stato identificato un pattern di risposta immunitaria innata che sembrerebbe differenziare gli isolati di PRRSV con una certa patogenicità *in vivo* rispetto a quelli attenuati. In particolare, l'isolato attenuato è stato l'unico a provocare il rilascio della citochina pro-infiammatoria IL-1 beta, la quale porta ad una precoce attivazione fagocitaria. In condizioni infiammatorie, in presenza di pregressa risposta IL-1 beta, il ceppo attenuato non incrementa tale risposta a differenza invece dei ceppi patogeni. Una possibile chiave di lettura dei nostri risultati è la capacità di alcuni isolati di PRRSV di evadere la risposta immunitaria innata, impedendo così l'attivazione fagocitaria iniziale che precede i meccanismi di clearance del patogeno ed i successivi fenomeni apoptotici (Costers et al., 2008). È infatti noto che il macrofago non infiammatorio consente una replicazione virale molto più elevata (Yoo et al., 2010).

Per quanto riguarda IL-10 (ad effetto anti-infiammatorio), potrebbe avere un effetto permissivo ad una replicazione virale ad alto titolo e favorire paradossalmente risposte infiammatorie in corso come descritto in altre patologie (Lauw et al., 2000). Un altro aspetto che aprirebbe un interessante campo di ricerca, sarebbe quello di integrare i dati relativi alla risposta immunitaria con quelli forniti dalle analisi genomiche.

Ciò che abbiamo visto conferma la possibilità che esistano “immunotipi” del virus della PRRS, come già ipotizzato da altri studi (Gimeno et al., 2011). È quindi possibile classificare gli isolati di campo in base al comportamento che mostrano nei confronti delle cellule dell'immunità innata, sulla base delle citochine indotte *in vitro*. Il passo immediatamente successivo è quello del confronto, sulla base di quanto sopra indicato, dei diversi ceppi circolanti inter e intra allevamento.

## CONCLUSIONI

Il diverso impatto clinico che gli isolati del virus della PRRS mostrano in campo trova un'analogia nella risposta immunitaria innata che abbiamo valutato *in vitro*. Gli isolati dotati di maggior patogenicità sembrano modulare la secrezione citochinica a loro favore, impedendo l'insorgenza di una risposta infiammatoria primaria atta a bloccare l'efficace replicazione del virus. La misurazione *in vitro* della risposta immunitaria innata potrebbe quindi aiutarci nella miglior comprensione di ciò che accade in campo. In conclusione, un approccio come quello descritto in questo lavoro potrebbe aggiungere utili dettagli per la valutazione della patogenicità di eventuali nuovi isolati di PRRSV rilevati in un allevamento.

## 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. Costers, S., D. J. Lefebvre, P. L. Delputte, and H. J. Nauwynck, 2008, Porcine reproductive and respiratory syndrome virus modulates apoptosis during replication in alveolar macrophages: *Arch Virol*, v. 153, p. 1453-65.
3. Gimeno, M., L. Darwich, I. Diaz, E. de la Torre, J. Pujols, M. Martín, S. Inumaru, E. Cano, M. Domingo, M. Montoya, and E. Mateu, 2011, Cytokine profiles and phenotype regulation of antigen presenting cells by genotype-I porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates: *Vet Res*, v. 42, p. 9.
4. Kappes, M. A., and K. S. Faaborg, 2015, PRRSV structure, replication and recombination: Origin of phenotype and genotype diversity: *Virology*, v. 479-480, p. 475-86.
5. Lauw, F. N., D. Pajkrt, C. E. Hack, M. Kurimoto, S. J. van Deventer, and T. van der Poll, 2000, Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia: *J Immunol*, v. 165, p. 2783-9.
6. Li, J., Y. Yin, B. Guo, S. Zhou, Y. Zhang, X. Liu, and T. Sun, 2012, Sequence analysis of the NSP2, ORF5, and ORF7 genes of 11 PRRS virus isolates from China: *Virus Genes*, v. 45, p. 256-64.
7. Murtaugh, M. P., 2012, Use and interpretation of sequencing in PRRSV control programs: Allen D. Leman Swine Conference.
8. Neumann, E. J., J. B. Kliebenstein, C. D. Johnson, J. W. Mabry, E. J. Bush, A. H. Seitzinger, A. L. Green, and J. J. Zimmerman, 2005, Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States: *J Am Vet Med Assoc*, v. 227, p. 385-92.
9. Petry, D. B., J. W. Holl, J. S. Weber, A. R. Doster, F. A. Osorio, and R. K. Johnson, 2005, Biological responses to porcine respiratory and reproductive syndrome virus in pigs of two genetic populations: *J Anim Sci*, v. 83, p. 1494-502.
10. Yoo, D., C. Song, Y. Sun, Y. Du, O. Kim, and H. C. Liu, 2010, Modulation of host cell responses and evasion strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome virus: *Virus Res*, v. 154, p. 48-60.

# **ESCHERICHIA COLI ISOLATI DA MATRICI PATOLOGICHE DI SUINO IN EMILIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021: VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI E DEI FATTORI DI VIRULENZA**

## **ANTIMICROBIAL RESISTANCE EVALUATION AND DETECTION OF VIRULENT FACTORS IN ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM SWINE IN EMILIA ROMAGNA FROM 2017 TO 2021**

BOSCO C<sup>1</sup>., BONILAUDI P<sup>1</sup>., RUGNA G<sup>1</sup>., LUPPI A<sup>1</sup>., FONTANA M.C<sup>1</sup>.,  
FIORENTINI L.<sup>1</sup>, BASSI P<sup>1</sup>.

*<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna  
"Bruno Ubertini" (IZSLER)*

**Parole chiave:** antibiotico-resistenza, *Escherichia coli*, ETEC

**Key words:** antimicrobial-resistance, *Escherichia coli*, ETEC

### **RIASSUNTO**

Sono stati valutati, retrospettivamente, le resistenze agli antibiotici e la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità di 826 *Escherichia coli*, isolati da matrici patologiche di suini durante l'attività diagnostica delle Sedi Territoriali dell'Emilia Romagna dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021. Complessivamente, le percentuali di resistenza più elevate erano rivolte verso ampicillina - AMP (95,9%), tetraciclina - TET (89,7%), cefazolina - CZ (79,3%) e trimetoprim + sulfametossazolo - SXT (74,8%). Inoltre, dal 2017 al 2021, le percentuali di resistenza degli 826 isolati nei confronti di AMP sono significativamente aumentate ( $p < 0,05$ ) fino a raggiungere il 99,2% di ceppi resistenti. In funzione della presenza dei geni codificanti i fattori di patogenicità (n. 671), gli isolati ETEC F18+ erano significativamente più resistenti a florfenicolo - FFC, gentamicina - GEN, kanamicina - KAN e SXT rispetto ai ceppi ETEC F4+. Gli isolati privi di geni codificanti i fattori di patogenicità sono risultati maggiormente resistenti a amoxicillina con acido clavulanico - AMC e a CZ ( $p < 0,01$ ) e significativamente meno resistenti a GEN ( $p < 0,01$ ). Analizzando l'andamento negli anni 2017 - 2021 delle resistenze dei soli isolati ETEC, si è potuto osservare un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) dei ceppi F18+ resistenti a FFC (70% - 95,8%), GEN (70% - 91,7%) e KAN (50% - 91,7%). Infine, negli anni considerati, si è verificato un aumento statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) degli ETEC F18+ contemporaneamente resistenti a tutte le molecole testate (10/10).

### **ABSTRACT**

The antimicrobial resistance and the presence of fimbriae and toxic genes of 826 *Escherichia coli* were evaluated retrospectively. The *E. coli* were isolated from pathological samples of pigs collected during the diagnostic activity of public laboratories (IZSLER) in Emilia Romagna (Italy) between 2017 and 2021. The highest overall resistance rates were referred to ampicillin - AMP (95,9%), tetracycline - TET (89,7%), cefazolin - CZ (79,3%) e trimethoprim + sulfamethoxazole - SXT (74,8%). Moreover, from 2017 to 2021, resistance rates of the 826 isolates to AMP were significantly increased ( $p < 0,05$ ) up to 99,2% of resistant strains. With regards to virulence factors genes (n. 671), ETEC F18+ (n. 230) were significantly more resistant to florfenicol - FFC, gentamicin - GEN, kanamycin - KAN

and SXT than ETEC F4+ (n 144) strains ( $p<0,01$ ). *E. coli* without virulence factors genes were more resistant to amoxicillin with clavulanic acid - AMC and CZ ( $p<0,01$ ) and less resistant to GEN ( $p<0,01$ ). During the study period, a statistically significant proportion of ETEC F18+ isolates increased the resistance to FFC (70% - 95,8%), GEN (70% - 91,7%) and KAN (50% - 91,7%) ( $p<0,05$ ). Finally, from 2017 to 2021, a statistically significant increase of the ETEC F18+ resistant to all the tested antibiotics was recorded ( $p<0,05$ ).

## INTRODUZIONE

Le colibacillosi enteriche del suino sono sostenute principalmente da patotipi ETEC (*E. coli* enterotossigeni) e, in minor misura, da patotipi EPEC (*E. coli* enteropatogeni). I ceppi ETEC esprimono la loro patogenicità aderendo attraverso le fimbrie a specifici recettori presenti sull'orletto a spazzola dell'intestino, colonizzandone l'epitelio e producendo enterotossine. Le fimbrie coinvolte nelle colibacillosi enteriche del suino sono nella maggioranza dei casi F4 e F18; in minor misura F41, F5 e F6. Le tossine prodotte da ETEC si distinguono in termostabili (STa e STb) e termolabili (LT) (Luppi, 2017), ma si può riscontrare anche la Shiga tossina 2e (Stx2e), che può essere prodotta sia da ETEC sia da STEC (*E. coli* produttori di Shiga tossina), questi ultimi responsabili, nel suino, della malattia degli edemi. Luppi *et al.*, già nel 2015, evidenziavano un aumento di resistenza significativo ad alcune molecole ad attività antibiotica (fluorochinoloni, fenicoli, e cefalosporine di IV generazione) da parte di *E. coli* F4+ isolati da matrici suine dal 2002 al 2011 durante l'attività diagnostica della sede territoriale IZSLER di Reggio Emilia. Considerando che i consumi di antibiotici per uso veterinario determinano il grado di pressione selettiva esercitata sulle popolazioni batteriche negli allevamenti, l'Italia si è impegnata, nel 2017, ad attuare politiche di riduzione dei consumi di antibiotico nel settore veterinario (Piano Nazionale di Contrasto all'Antimicrobico-Resistenza -PNCAR), come risulta dall'ultimo report ESVAC (EMA, 2020) dove appare una riduzione delle vendite di antibiotico del 10,9% nel 2018 rispetto all'anno precedente. Nonostante questi risultati, il nostro Paese appare ancora al secondo posto in Europa nella classifica dei quantitativi di vendita degli antibiotici ad uso veterinario (EMA, 2020). Dati i risultati ottenuti da Luppi *et al.* nel 2015 relativamente ai soli *E. coli* F4+, in questo lavoro, abbiamo esteso l'analisi delle resistenze agli antibiotici espresse da *E. coli* isolati in Emilia Romagna da matrici suine dagli anni 2017 al 2021, indagando eventuali correlazioni con la presenza di fattori di patogenicità.

## MATERIALI E METODI

I dati utilizzati derivano dall'attività dei laboratori diagnostici delle sedi territoriali dell'Emilia Romagna dell'IZSLER, considerando nei criteri di ricerca *E. coli* isolati da matrici provenienti da suini (carcasse, feci, visceri) dal 2017 al 2021 e sottoposti a ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità degli ETEC e ad antibiogramma.

La ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità è stata effettuata attraverso metodica multiplex PCR per geni codificanti le adesine F4 (k88), F5 (k99), F6 (987p) e F18 e le tossine LT I, STaP, STb e Stx2e, utilizzando i primers riportati da Casey & Bosworth (2009). Tra i ceppi risultati positivi ad almeno un gene codificante per fattore di patogenicità, sono stati considerati ETEC solo quegli isolati in cui erano associati un fattore di patogenicità fimbriale e almeno un gene codificante per un'enterotossina. Gli antibiogrammi sono stati effettuati con la metodica di disco-diffusione (Kirby-Bauer), la classificazione in sensibili, intermedi e resistenti è stata fatta utilizzando criteri interpretativi basati su standards noti (*Clinical and Laboratory Standards Institute* - CLSI, 2015-2018). Sulla base dei criteri considerati sono stati analizzati i dati di 826 isolati per Acido Nalidixico (NA 30 µg),

Amoxicillina e Acido Clavulanico (AMC 20 – 10 µg), Ampicillina (AMP 10 µg), Cefazolina (CZ 30 µg), Enrofloxacin (ENR 5 µg), Florfenicolo (FFC 30 µg), Gentamicina (GEN 10 µg), Kanamicina (KAN 30 µg), Tetraciclina (TET 30 µg), Trimetoprim e Sulfametossazolo (SXT 1,25 – 23,75 µg). Per la valutazione statistica, ai fini dell'espressione della resistenza agli antibiotici, i ceppi identificati come intermedi sono stati categorizzati con i resistenti. Per ciascuna molecola sono state esaminate le resistenze espresse da tutti gli *E. coli* isolati nel campione (n. 826) e confrontate tra diversi tipi fimbriali, attraverso test di chi quadro e test esatto di Fisher e le differenze sono state considerate statisticamente significative per  $p < 0,01$ . L'esistenza di correlazione tra l'anno di isolamento (2017 – 2021) e la frazione di ceppi resistenti nei vari raggruppamenti precedentemente illustrati (soppesate per la differente numerosità di ceppi isolati negli anni), è stato valutato, attraverso il Pearson's Correlation test ( $r$  di Pearson). Inoltre, sia per il campione complessivo che per i diversi tipi fimbriali, è stata valutata la correlazione tra resistenza a più molecole contemporaneamente e gli anni di isolamento. L'andamento in diminuzione o aumento nel tempo delle resistenze è stato considerato statisticamente significativo per  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

Degli 826 ceppi isolati, 671 sono risultati positivi per la presenza di almeno un fattore di patogenicità, di cui i maggiormente rappresentati erano F18+ (n. 272) e F4+ (n. 170). Relativamente al solo patotipo ETEC, i virotipi più rappresentati erano F18 STa, STb; F18 STa, STb LT; F4 STa, STb LT; F4 STb, LT e F4 STa, STb.

Considerando il totale dei ceppi isolati negli anni, la resistenza maggiore è stata espressa nei confronti dell'AMP con 791/826 (95,9%) isolati, seguita da TET (89,7%), CZ (79,3%) e SXT (74,8%) come evidenziato in Tabella 1. Per tutte le molecole testate le percentuali di resistenza degli 826 isolati erano superiori al 50%, e maggiori del 70% per 5/10 molecole. Al contrario, ENR e KAN si sono dimostrate le molecole con maggior attività antimicrobica conservata (rispettivamente 57,1% e 59,3% degli isolati resistenti).

Il 98,7% degli isolati privi di fattori di patogenicità è risultato resistente ad AMP. Inoltre, questa categoria ha mostrato resistenze significativamente superiori verso AMC (76,8%) e CZ (87,7%), rispetto agli isolati positivi per almeno un gene codificante i fattori di patogenicità (62%, 77,3%) (Tabella 1). Nei confronti di GEN, invece, gli isolati negativi per fattori di patogenicità hanno mostrato resistenze significativamente inferiori (49% - 64,2%).

Confrontando le sensibilità rivelate dagli isolati ETEC, rispetto ai ceppi F4+, i ceppi F18+ hanno mostrato resistenze significativamente superiori per SXT (84,8% - 61,1%), FFC (81,3% - 61,8%) GEN (80% - 56,9%) e KAN (67,8% - 54,2%) - (Tabella 1).



**Tabella 1:** Numero e percentuale di isolati resistenti a AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT. \*percentuali con  $p<0,01$ ; \*\*percentuali con  $p<0,05$

**Table 1:** Number and percentage of isolates resistant to AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT. \*percentages with  $p<0,01$ ; \*\*percentages with  $p<0,05$

| ISOLATI RESISTENTI   |          |      |                               |        |                               |        |          |        |           |        |
|----------------------|----------|------|-------------------------------|--------|-------------------------------|--------|----------|--------|-----------|--------|
|                      | Campione |      | Fattori patogenicità positivi |        | Fattori patogenicità negativi |        | ETEC F4+ |        | ETEC F18+ |        |
|                      | N°       | %    | N°                            | %      | N°                            | %      | N°       | %      | N°        | %      |
| AN                   | 598      | 72,4 | 497                           | 74,1** | 101                           | 65,2** | 113      | 78,5   | 178       | 77,4   |
| AMC                  | 534      | 64,8 | 416                           | 62*    | 119                           | 76,8*  | 87       | 60,4   | 137       | 59,6   |
| AMP                  | 791      | 95,9 | 639                           | 95,2   | 153                           | 98,7   | 137      | 95,1   | 219       | 95,2   |
| CZ                   | 654      | 79,3 | 519                           | 77,3*  | 136                           | 87,7*  | 116      | 80,6   | 177       | 77     |
| ENR                  | 471      | 57,1 | 386                           | 57,5   | 86                            | 55,5   | 92       | 63,9** | 120       | 52,2** |
| FFC                  | 527      | 63,9 | 443                           | 66**   | 85                            | 54,8** | 89       | 61,8*  | 187       | 81,3*  |
| GEN                  | 506      | 61,4 | 431                           | 64,2*  | 76                            | 49*    | 82       | 56,9*  | 184       | 80*    |
| KAN                  | 489      | 59,3 | 406                           | 60,5   | 84                            | 54,2   | 78       | 54,2*  | 156       | 67,8*  |
| TET                  | 740      | 89,7 | 601                           | 89,6   | 140                           | 90,3   | 123      | 85,4** | 216       | 93,9** |
| SXT                  | 617      | 74,8 | 506                           | 75,4   | 112                           | 72,3   | 88       | 61,1*  | 195       | 84,8*  |
| totale ceppi testati | 826      |      | 671                           |        | 155                           |        | 144      |        | 230       |        |

Complessivamente, dal 2017 al 2021, si è osservato un aumento statisticamente significativo delle percentuali di resistenza ad AMP (da 93,5% a 99,2%) come riportato in Tabella 2. Relativamente agli ETEC, le resistenze dei ceppi F18+ sono aumentate significativamente per 3/10 molecole testate (FFC, GEN, KAN). Le percentuali di resistenza di *E. coli* ETEC F4+, invece, non hanno subito aumenti statisticamente significativi negli anni per nessuna molecola, ma nei confronti dell'AMP hanno mostrato resistenza nel 100% dei casi nel 2021. Il 18,3 % degli 826 isolati testati è risultato resistente a tutti i 10 antibiotici testati, il 76,5% è risultato resistente a 6 o più delle 10 molecole considerate (multiresistente) e solo 4/826 (0,5%) degli isolati sono risultati completamente sensibili alle molecole testate. Considerando l'andamento nel tempo, la percentuale di isolati multiresistenti a 6 o più molecole contemporaneamente nel periodo compreso tra il 2017 e il 2021 non mostra sostanziali variazioni, sia per il campione totale sia per gli ETEC. Valutando solamente i ceppi ETEC F18+ però, si può osservare un aumento delle percentuali di isolati multiresistenti a 10/10 molecole dal 2017 al 2021 (da 10% a 45,8%) Tabella 3.

**Tabella 2:** Percentuali di isolati resistenti/anno a AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT distinti per campione complessivo, ETEC F18+ e ETEC F4+. Le resistenze aumentate negli anni ( $p<0,05$ ) sono evidenziate.

**Table 2:** Percentage of resistant isolates/year to AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT for the totale in sample, ETEC F18+ and ETEC F4+. Resistances with significative growth during the years ( $p<0, 05$ ) are highlighted.

|                                 | Percentuali di isolati resistenti/anno |            |            |            |            | Analisi statistica |       |
|---------------------------------|----------------------------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|-------|
|                                 | 2017                                   | 2018       | 2019       | 2020       | 2021       | r                  | p     |
| <b>Campione<br/>n° isolati</b>  | <b>107</b>                             | <b>125</b> | <b>217</b> | <b>257</b> | <b>120</b> |                    |       |
| AN                              | 84,1                                   | 73,6       | 68,7       | 69,3       | 74,2       | -0,6187            | >0.05 |
| AMC                             | 61,7                                   | 52,8       | 63,1       | 68,9       | 74,2       | 0,871              | >0.05 |
| AMP                             | 93,5                                   | 94,4       | 95,9       | 96,1       | 99,2       | 0,9554             | <0.05 |
| CZ                              | 73,8                                   | 83,2       | 78,3       | 80,5       | 79,2       | 0,3689             | >0.05 |
| ENR                             | 64,5                                   | 64,8       | 54,4       | 51         | 60,8       | -0,5405            | >0.05 |
| FFC                             | 61,7                                   | 65,6       | 63,1       | 62,3       | 69,2       | 0,5984             | >0.05 |
| GEN                             | 58,9                                   | 55,2       | 64,5       | 61,9       | 63,3       | 0,6559             | >0.05 |
| KAN                             | 48,6                                   | 54,4       | 63,1       | 63         | 59,2       | 0,759              | >0.05 |
| TET                             | 92,5                                   | 96         | 92,6       | 85,2       | 85         | -0,8303            | >0.05 |
| SXT                             | 70,1                                   | 73,6       | 78,8       | 75,1       | 72,5       | 0,3082             | >0.05 |
| <b>ETEC F18+<br/>n° isolati</b> | <b>20</b>                              | <b>34</b>  | <b>76</b>  | <b>76</b>  | <b>24</b>  |                    |       |
| AN                              | 90                                     | 79,4       | 68,4       | 77,6       | 91,7       | 0,0257             | >0.05 |
| AMC                             | 50                                     | 38,2       | 59,2       | 65,8       | 79,2       | 0,8749             | >0.05 |
| AMP                             | 95                                     | 97,1       | 96,1       | 93,4       | 95,8       | -0,2289            | >0.05 |
| CZ                              | 65                                     | 91,2       | 73,7       | 75         | 83,3       | 0,3248             | >0.05 |
| ENR                             | 55                                     | 79,4       | 42,1       | 48,7       | 54,2       | -0,3624            | >0.05 |
| FFC                             | 70                                     | 79,4       | 80,3       | 81,6       | 95,8       | 0,9185             | <0.05 |
| GEN                             | 70                                     | 79,4       | 80,3       | 78,9       | 91,7       | 0,8794             | <0.05 |
| KAN                             | 50                                     | 50         | 71,1       | 69,7       | 91,7       | 0,937              | <0.05 |
| TET                             | 95                                     | 100        | 96,1       | 90,8       | 87,5       | -0,791             | >0.05 |
| SXT                             | 65                                     | 88,2       | 88,2       | 85,5       | 83,3       | 0,5509             | >0.05 |
| <b>ETEC F4+<br/>n° isolati</b>  | <b>25</b>                              | <b>27</b>  | <b>40</b>  | <b>37</b>  | <b>15</b>  |                    |       |
| AN                              | 88                                     | 85,2       | 67,5       | 73         | 93,3       | -0,0227            | >0.05 |
| AMC                             | 60                                     | 55,6       | 60         | 59,5       | 73,3       | 0,7129             | >0.05 |
| AMP                             | 96                                     | 92,6       | 95         | 94,6       | 100        | 0,5782             | >0.05 |
| CZ                              | 88                                     | 81,5       | 77,5       | 83,8       | 66,7       | -0,7868            | >0.05 |
| ENR                             | 72                                     | 66,7       | 57,5       | 59,5       | 73,3       | -0,1003            | >0.05 |
| FFC                             | 60                                     | 66,7       | 55         | 62,2       | 73,3       | 0,5045             | >0.05 |
| GEN                             | 60                                     | 51,9       | 47,5       | 64,9       | 66,7       | 0,5032             | >0.05 |
| KAN                             | 48                                     | 55,6       | 50         | 59,5       | 60         | 0,8109             | >0.05 |
| TET                             | 92                                     | 96,3       | 82,5       | 75,7       | 86,7       | -0,6144            | >0.05 |
| SXT                             | 68                                     | 51,9       | 60         | 59,5       | 73,3       | 0,3475             | >0.05 |

**Tabella 3:** Percentuali di isolati resistenti contemporaneamente a n° molecole (da 1 a 10) e a  $\geq 6$  molecole negli anni dal 2017 al 2021, raggruppate per campione complessivo, ETEC F18+ e ETEC F4+. Le variazioni significative ( $p < 0,05$ ) sono evidenziate.

**Table 3:** Percentages of isolates contemporaneously resistant to n° antibiotics (from 1 to 10) and to  $\geq 6$  antibiotics from 2017 to 2021, listed by all the isolates, ETEC F18+ and ETEC F4+. Significant variations ( $p < 0,05$ ) are highlighted.

|                               | Percentuali multiresistenze/anno              |            |            |            |            | Analisi statistica |       |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|-------|
|                               | 2017                                          | 2018       | 2019       | 2020       | 2021       | r                  | p     |
|                               | <b>Campione complessivo: n° ceppi testati</b> |            |            |            |            |                    |       |
| <b>n° molecole resistenti</b> | <b>107</b>                                    | <b>125</b> | <b>217</b> | <b>257</b> | <b>120</b> |                    |       |
| 1                             | 2,8                                           | 2,4        | 0,9        | 1,2        | 0,8        | -0,8977            | <0.05 |
| 2                             | 2,8                                           | 3,2        | 2,8        | 3,9        | 0,8        | -0,4521            | >0.05 |
| 3                             | 2,8                                           | 4,8        | 2,8        | 3,5        | 5,8        | 0,5616             | >0.05 |
| 4                             | 6,5                                           | 6,4        | 4,6        | 7,8        | 5,8        | -0,0048            | >0.05 |
| 5                             | 8,4                                           | 6,4        | 7,8        | 8,9        | 11,7       | 0,7404             | >0.05 |
| 6                             | 13,1                                          | 8,8        | 12,4       | 8,2        | 9,2        | -0,5925            | >0.05 |
| 7                             | 12,1                                          | 12,8       | 17,1       | 13,2       | 11,7       | -0,039             | >0.05 |
| 8                             | 15                                            | 20,8       | 19,8       | 14,4       | 14,2       | -0,3929            | >0.05 |
| 9                             | 14                                            | 20         | 15,7       | 20,2       | 15         | 0,1189             | >0.05 |
| 10                            | 21,5                                          | 14,4       | 15,7       | 17,9       | 25         | 0,3821             | >0.05 |
| $\geq 6$                      | 75,7                                          | 76,8       | 80,6       | 73,9       | 75         | 0,3821             | >0.05 |
|                               | <b>ETEC F18+: n° ceppi testati</b>            |            |            |            |            |                    |       |
| <b>n° molecole resistenti</b> | <b>20</b>                                     | <b>34</b>  | <b>76</b>  | <b>76</b>  | <b>24</b>  |                    |       |
| 1                             | 0                                             | 2,9        | 0          | 1,3        | 0          | -0,1977            | >0.05 |
| 2                             | 0                                             | 0          | 1,3        | 3,9        | 0          | 0,3638             | >0.05 |
| 3                             | 0                                             | 0          | 1,3        | 0          | 0          | 0                  | >0.05 |
| 4                             | 5                                             | 5,9        | 1,3        | 2,6        | 4,2        | -0,4241            | >0.05 |
| 5                             | 10                                            | 0          | 10,5       | 3,9        | 8,3        | 0,0216             | >0.05 |
| 6                             | 20                                            | 5,9        | 11,8       | 10,5       | 0          | -0,7538            | >0.05 |
| 7                             | 5                                             | 8,8        | 17,1       | 15,8       | 8,3        | 0,4147             | >0.05 |
| 8                             | 25                                            | 41,2       | 17,1       | 13,2       | 20,8       | -0,5304            | >0.05 |
| 9                             | 20                                            | 23,5       | 18,4       | 25         | 12,5       | -0,4363            | >0.05 |
| 10                            | 10                                            | 11,8       | 19,7       | 22,4       | 45,8       | 0,9074             | <0.05 |
| $\geq 6$                      | 80                                            | 91,2       | 84,2       | 86,8       | 87,5       | 0,4062             | >0.05 |
|                               | <b>ETEC F4+: n° ceppi testati</b>             |            |            |            |            |                    |       |
| <b>n° molecole resistenti</b> | <b>25</b>                                     | <b>27</b>  | <b>40</b>  | <b>37</b>  | <b>15</b>  |                    |       |
| 1                             | 0                                             | 3,7        | 2,5        | 2,7        | 0          | -0,0937            | >0.05 |
| 2                             | 0                                             | 0          | 2,5        | 5,4        | 0          | 0,3567             | >0.05 |
| 3                             | 4                                             | 11,1       | 7,5        | 10,8       | 0          | -0,278             | >0.05 |
| 4                             | 8                                             | 3,7        | 7,5        | 5,4        | 6,7        | -0,0881            | >0.05 |
| 5                             | 12                                            | 3,7        | 7,5        | 2,7        | 6,7        | -0,5044            | >0.05 |
| 6                             | 16                                            | 14,8       | 15         | 8,1        | 13,3       | -0,6072            | >0.05 |
| 7                             | 8                                             | 11,1       | 20         | 10,8       | 26,7       | 0,7524             | >0.05 |
| 8                             | 8                                             | 14,8       | 22,5       | 21,6       | 6,7        | 0,0886             | >0.05 |
| 9                             | 28                                            | 22,2       | 5          | 10,8       | 13,3       | -0,7012            | >0.05 |
| 10                            | 16                                            | 14,8       | 10         | 21,6       | 26,7       | 0,6902             | >0.05 |
| $\geq 6$                      | 76                                            | 77,8       | 72,5       | 73         | 86,7       | 0,4561             | >0.05 |

## DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati emersi dagli antibiogrammi eseguiti sugli 826 isolati, ha mostrato elevate percentuali di resistenza nei confronti di ampicillina, tetraciclina, cefazolina e per l'associazione di trimetoprim + sulfametossazolo. Risultati simili sono stati ottenuti in studi condotti su *E. coli* isolati da suini sintomatici in Paesi europei, asiatici e americani in periodi compresi tra il 2005 e il 2018, dove le maggiori percentuali di resistenza agli antibiotici erano rivolte verso ampicillina (Do *et al.*, 2020; García-Meniño *et al.*, 2021; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020), tetraciclina (Brand *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2020; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020) e trimetoprim con sulfamidici in associazione o esaminati separatamente (Brand *et al.*, 2017; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020). In Spagna, inoltre, la molecola per cui gli isolati esprimevano la percentuale di resistenza maggiore era l'Acido Nalidixico (82,3%) (García-Meniño *et al.*, 2021), che in questo studio non era tra quelle con le percentuali di resistenza più elevate, ma si attestava comunque oltre al 70%. Il dato osservato, almeno per i Paesi europei, è coerente con quanto riportato da EMA (2020) nei rapporti di vendita dei prodotti antibiotici ad uso veterinario in Europa dal 2011 al 2018, dove appare evidente come i principi attivi maggiormente utilizzati in medicina veterinaria appartengano alle classi di tetracicline, penicilline e sulfamidici. Da quanto emerge da una review sul consumo di antibiotici nell'allevamento suino a livello globale, le classi di antibiotici più utilizzate in allevamento per questa specie risultano essere penicilline e tetracicline (Lekagul *et al.*, 2019). Valutando, nello specifico, l'andamento delle resistenze negli anni su tutti i ceppi di *E. coli* analizzati, abbiamo potuto osservare un incremento significativo della percentuale di isolati resistenti ad ampicillina (fino al 99,2% degli isolati nel 2021). In uno studio condotto in Germania sulle resistenze agli antimicrobici di *E. coli* isolati da suini sintomatici tra il 2006 e il 2017, le percentuali di resistenza degli isolati a tetraciclina, neomicina e spectinomomicina sono risultate significativamente diminuite negli anni (Moennighoff *et al.*, 2020), pur attestandosi a 60,48% di isolati resistenti nel 2017 per la tetraciclina. Nello studio condotto da Hayer *et al.* in USA, invece, le resistenze di *E. coli* che hanno mostrato un andamento significativamente in aumento dal 2011 al 2016 erano rivolte verso ampicillina, neomicina, gentamicina e trimetoprim+sulfametossazolo (Hayer *et al.*, 2020). Queste differenze possono essere originate da difformità nelle classi di molecole maggiormente impiegate nei diversi Paesi, che dipendono da numerose variabili come le politiche di riduzione dei consumi di antibiotico adottate, la disponibilità di formulazioni per il trattamento e lo stato sanitario medio delle aziende, nonché la tipologia produttiva prevalente.

### Resistenze, fattori di patogenicità e tipi fimbriali

Nei campioni analizzati, provenienti da matrici patologiche di suino, il 81,2% degli isolati è risultato positivo ad almeno uno dei geni codificanti per i fattori di patogenicità ricercati. Confrontando i ceppi in base alla presenza o assenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, è interessante notare come negli isolati non patogeni vi sia una percentuale di resistenza ad amoxicillina con acido clavulanico (76,8%) e a cefazolina (87,7%) significativamente maggiore rispetto agli isolati patogeni (62%, 77,3%). Isolati di *E. coli* provenienti da suini asintomatici vengono usati come indicatori di antimicrobico-resistenza (AMR) all'interno del Piano di Monitoraggio Armonizzato sulla Resistenza agli Antimicrobici, in quanto le resistenze riscontrate in questi ceppi sono rappresentative della pressione selettiva esercitata dall'uso di antibiotici in azienda, della diffusione clonale di microrganismi resistenti, della propagazione di plasmidi veicolanti i geni di resistenza e degli effetti della co-selezione in batteri multiresistenti (EFSA, 2020). Le resistenze da noi osservate in *E. coli* non patogeni, quindi, potrebbero essere considerate indicative

della pressione selettiva esercitata dagli antibiotici nelle aziende suinicole in Emilia Romagna. Nei 155 isolati di *E. coli* negativi per la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, le percentuali di resistenza più elevate erano espresse nei confronti di ampicillina, tetraciclina e cefazolina, dato parzialmente in accordo con quanto riportato dall'ultimo *Summary Report* dell'Unione Europea sull'antimicrobico-resistenza in batteri zoonotici e indicatori provenienti da uomo, animali e alimenti negli anni 2017/2018, per cui le maggiori resistenze espresse da *E. coli* indicatori isolati da suini in 31 Paesi (di cui 28 membri dell'UE) nel 2017 erano nei confronti di ampicillina, sulfametossazolo, trimetoprim e tetraciclina (EFSA, 2020).

Affinché un ceppo si possa definire ETEC è necessario che abbia almeno un gene codificante per un fattore di patogenicità fimbriale ed uno codificante per un'enterotossina (Baldo *et al.*, 2020). Considerando, però, la tossina Stx2e, generalmente caratteristica di ceppi STEC, vengono considerati ETEC solamente i ceppi in cui i geni codificanti per questa tossina sono presenti in ceppi F18+ con almeno un'enterotossina (Luppi *et al.*, 2016; Fairbrother *et al.*, 2012). In questo lavoro, il fattore fimbriale maggiormente frequente tra gli isolati considerati è stato F18 (50,3%) seguito da F4 (31,5%). Risultati simili sono stati ottenuti dalla ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità in 186 *E. coli* isolati da suini con diarrea in Spagna tra il 2005 e il 2017, dove il 43,5% dei ceppi esaminati erano F18+ e il 38,2% erano F4+ (García-Meniño *et al.*, 2021) e in 118 *E. coli* isolati da suini con diarrea post-svezzamento in Korea tra il 2016 e il 2017, di cui il 40,7% era F18+ e il 16,9% era F4+ (Do *et al.*, 2020). In studi precedenti, ETEC F4+ risultavano essere nettamente prevalenti rispetto agli ETEC F18+ (Luppi *et al.*, 2014). Mentre nel 2016, in uno studio condotto in diversi Paesi europei (Belgio, Francia, Germania, Italia e Olanda) tra il 2012 e il 2014, si iniziava ad osservare un trend di aumento degli ETEC F18+ (33,9%) isolati in corso di diarrea post-svezzamento nonostante fossero ancora prevalenti gli ETEC F4+ (45,1%) (Luppi *et al.*, 2016). Questa inversione della prevalenza tra F4+ e F18+ potrebbe rappresentare l'evoluzione del tempo di questi due tipi fimbriali che può essere stata determinata da differenti concause. Per il controllo della forma clinica è da diversi anni disponibile un vaccino orale con ceppi non virulenti, che in prima formulazione prevedeva la sola presenza di ceppi F4+, mentre successivamente il vaccino è stato migliorato e proposto in forma bivalente (F4/F18) (Garcia *et al.*, 2020). Inoltre, è noto da molti anni come la genetica degli animali svolga un ruolo rilevante nella suscettibilità ai ceppi F4+ (Bijlsma *et al.*, 1982; Hu *et al.*, 1993). Alcuni paesi europei, come la Danimarca hanno implementato da molti anni strategie di selezione degli animali per ridurre la frequenza di geni che codificano per la forma recettoriale sensibile all'adesione dei ceppi F4 nella popolazione suina. Per cui la oramai larga diffusione di genetiche danesi all'interno della suinicoltura italiana, potrebbe aver avuto un ruolo importante nell'inversione di prevalenza tra F4+ e F18+. In ogni caso, d'accordo con Torreggiani *et al.* (2021) è difficile stabilire se ed eventualmente quanto, l'impiego dei vaccini sopracitati o le altre componenti di natura genetica possano aver in effetti governato questa inversione della prevalenza tra i due virotipi. Infine, nel nostro studio, di 671 isolati positivi per la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, il 28,6% non è stato classificato come ETEC in quanto positivo solo per un gene codificante una fimbria o una tossina. Tale dato è in accordo con quanto osservato da Luppi *et al.* nel 2016 (28,3%) e potrebbe essere legato alla presenza di altri fattori di patogenicità non ricercati in questo studio. Un esempio è dato dall'adesina AIDA e dalla tossina EAST-1, che possono essere associate a ETEC isolati da suini sintomatici, ed il cui ruolo non è ancora definito (Luppi *et al.*, 2016). I ceppi ETEC F18+ sono risultati maggiormente resistenti a trimetoprim + sulfametossazolo, florfenicolo, gentamicina e kanamicina rispetto ai ceppi ETEC F4+ in modo statisticamente significativo. Luppi *et al.*

nel 2015 aveva osservato un significativo aumento delle percentuali di resistenza di *E. coli* F4+ isolati tra il 2002 e il 2011 a enrofloxacin, marbofloxacin, flumechina, danofloxacin, florfenicolo, tiamfenicolo e cefquinome. Nel nostro caso la resistenza dei ceppi ETEC F4+ al florfenicolo è aumentata in modo non statisticamente significativo dal 2017 (60%) al 2021 (73,3%) mentre, per quanto riguarda l'enrofloxacin, da quanto descritto da Luppi *et al.*, la percentuale di ETEC F4+ resistenti a enrofloxacin nel 2011 (89,3%) era maggiore rispetto alle percentuali di resistenza per questa molecola ottenute nel nostro studio per ognuno degli anni considerati (Luppi *et al.*, 2015). Anche questo dato potrebbe in effetti essere giustificato come un importante risvolto della vaccinazione o della selezione genetica degli animali, che riducendo la frequenza di ceppi F4+ in allevamento ne ha anche ridotto la capacità di accumulare geni di resistenza agli antibiotici.

Infine, vi sono antibiotici in cui il livello di resistenza osservato ha raggiunto il massimo possibile, come l'ampicillina, per cui abbiamo riscontrato la percentuale maggiore di resistenza espressa dagli isolati del campione complessivo, ed è risultata non efficace (R:100%) in tutti i ceppi F4+ testati nel 2021 (n. 15). Inoltre, considerando tutte le categorie analizzate in questo studio, l'ampicillina è sempre stata la molecola verso cui si registrava più elevata percentuale di resistenza attestandosi sempre su valori maggiori del 90%. La valutazione del consumo di antibiotico effettuata su aziende suinicole dell'Emilia Romagna tra il 2016 e il 2018 (Bassi *et al.*, 2020), ha evidenziato come le aminopenicilline siano la classe di molecole più utilizzate in scrofe, suinetti sottoscrofa e suinetti svezzati. Alla luce di queste considerazioni, è necessario porre l'attenzione sull'uso di queste molecole in allevamento, soprattutto attraverso la via di somministrazione orale, responsabile della maggior esposizione delle enterobatteriacee alle molecole somministrate.

### **Multiresistenze**

Gli 826 *E. coli* esaminati sono risultati contemporaneamente resistenti a 6 o più delle 10 molecole testate (multiresistenti) in più del 70% dei casi. Inoltre, solo 4 isolati erano completamente suscettibili a tutti i 10 antibiotici (0,5%). Valutando l'andamento delle multiresistenze negli anni, questo è risultato aumentare in maniera significativa negli ETEC F18+ resistenti a tutte le molecole testate (10/10). Riguardo, invece, i soli ETEC F4+ non è stato osservato un aumento significativo negli anni dei multiresistenti, diversamente da quanto osservato da Luppi *et al.* nel 2015. Il trend delle multiresistenze espresse da ceppi ETEC F4+ tra il 2002 e il 2011, infatti, era risultato significativamente aumentato per gli isolati resistenti a 6-8 molecole e per quelli resistenti a 9-12 antibiotici contemporaneamente (Luppi *et al.*, 2015).

### **CONCLUSIONI**

I risultati ottenuti da questo studio pongono l'attenzione sulla pressione selettiva esercitata dagli antibiotici nell'allevamento suino nelle aziende dell'Emilia Romagna. Le resistenze agli antibiotici degli 826 *E. coli* considerati sono risultate maggiori nei confronti delle classi di molecole maggiormente utilizzate nell'allevamento suinicolo, indipendentemente dalla patogenicità dei ceppi rilevati. Questo dato, oltre a rispecchiare l'elevato grado di diffusione delle resistenze all'interno della flora enterica commensale, sottolinea anche una minor capacità terapeutica nei confronti delle manifestazioni sostenute da *E. coli* ETEC. Quanto osservato conferma la necessità di intraprendere politiche di riduzione del consumo degli antibiotici attraverso l'uso razionale di questi ultimi. A questo scopo le terapie antibiotiche dovrebbero essere mirate e quindi successive alla diagnosi eziologica e al saggio della sensibilità agli antibiotici dell'agente patogeno circolante nell'allevamento, come indicato nelle Linee guida Regionali sull'uso prudente dell'antibiotico pubblicate



dalla Regione Emilia-Romagna (2018). Inoltre, la corretta gestione degli interventi vaccinali e delle misure di biosicurezza interna ed esterna assume particolare rilevanza ai fini della riduzione dell'uso di antibiotici in allevamento prevenendo l'instaurarsi ed il propagarsi di malattie infettive in azienda.

## RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è parzialmente finanziato dal Ministero della Salute PRC2019003

## BIBLIOGRAFIA

1. Baldo V., Salogni C., Giovannini S., D'Incau M., Boniotti M.B., Birbes L., Pitozzi A., Formenti N., Grassi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2020) "Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis". *Front Vet Sci.* 7:545818.
2. Bassi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Trevisi P., Rugna G., Motta V., Diegoli G., Meriardi G. (2020) "Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia Romagna nel triennio 2016-2018" SIPAS in stampa.
3. Brand P., Gobeli S., Perreten V. (2017) "Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014-2015)". *Schweiz Arch Tierheilkd.* 159(7):373-380.
4. Bijlsma I.G.W., De Nijs A., Van Der Meer C., Frik J.F. (1982) "Different pig phenotypes affect adherence of *Escherichia coli* to jejunal brush borders by K88ab, K88ac, or K88ad antigen." *Infect Immun* 37:891-894.
5. Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine". *J Vet Diagn Invest.* 21(1):25-30.
6. Do K.H., Byun J.W., Lee W.K. (2020) "Virulence genes and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic weaned piglets in Korea". *J Anim Sci Technol.* 62(4):543-552.
7. European Food Safety Authority (EFSA) (2020) "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018". *EFSA Journal*; 18(3):6007.
8. European Medicine Agency (EMA) - European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) Project (2020). Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2018 (EMA/24309/2020).
9. Fairbrother J. M., Gyles C.L. (2012) "Colibacillosis" in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Disease of Swine", 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 723-749.
10. García-Meniño I., García V., Alonso M.P., Blanco J.E., Blanco J., Mora A. (2021) "Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance". *Vet Microbiol.* 252:108924.
11. Garcia V. (2020) "Intestinal adhesion and subsequent colonization by ETEC depends on F4- or F18-specific receptors, the presence of which is essential for ETEC to cause disease" *American society for Microbiology*
12. Hayer S.S., Rovira A., Olsen K., Johnson T.J., Vannucci F., Rendahl A., Perez A., Alvarez J. (2020) "Prevalence and trend analysis of antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates collected from diseased pigs in the USA between 2006 and 2016". *Transbound Emerg Dis.* 1-12.

13. Hu Z.L., Hasler-Rapacz J., Huang S.C., Rapacz J. (1993) "Studies in swine on inheritance and variation in expression of small intestinal receptors mediating adhesion of the K88 enteropathogenic *Escherichia coli* variants." *J Hered* 84:157–165.
14. Lekagul A., Tangcharoensathien V., Yeung S. (2019) "Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review". *Vet Anim Sci.* 7:100058.
15. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Gherpelli Y., Biasi G., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2015) "Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy". *Transbound Emerg Dis.* 62(1):67-71.
16. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Rosamilia A., Biasi G., Maioli G., Dottori M. (2014) "Prevalence of F4 hemolytic *E. coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea" *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress* June 8 – 11, Cancun, Quintana Roo, Mexico, vol. II, 469.
17. Luppi A., Gibellini M., Gin T., Vangroenweghe F., Vandenbroucke V., Bauerfeind R., Bonilauri P., Labarque G., Hidalgo Á. (2016) "Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe". *Porcine Health Manag.* 2:20.
18. Luppi A. (2017) "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance". *Porcine Health Manag.* 3:16.
19. Moennighoff C., Thomas N., Nienhaus F., Hartmann M., Menrath A., Merkel J., Detlefsen H., Kreienbrock L., Hennig-Pauka I. (2020) "Phenotypic antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from swine husbandries in North Western Germany - temporal patterns in samples from laboratory practice from 2006 to 2017". *BMC Vet Res.* 16(1):37.
20. Moredo F.A., Piñeyro P.E., Márquez G., Sanz M., Colello R., Etcheverría A., Padola N.L., Quiroga M.A., Perfumo C.J., Galli L., Leotta G.A. (2015). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles". *Foodborne Pathog Dis.* 12(8):704-11.
21. Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico Resistenza (PNCAR). Ministero della Salute, Italia.
22. [https://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2660\\_allegato.pdf](https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf)
23. Regione Emilia Romagna (2018) "Linee Guida Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino",
24. <https://www.alimenti-salute.it/content/linee-guida-uso-antibiotici-nellallevamento-suino>
25. Renzhammer R., Loncaric I., Roch F.F., Pinior B., Käsbohrer A., Spargser J., Ladinig A., Unterwiesing C. (2020) "Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria". *Antibiotics (Basel).* 9(4):208.
26. Torreggiani C., Prosperi A., Chiapponi C., Manfredi R., Baioni L., Baraldini E., Dottori M., Rugna G., Bassi P., Alborali G.L., Vezzoli F., Luppi A. (2021) "*Escherichia coli* Enterotossigeni isolati da focolai di Colibacillosi Enterica nel Post-Svezzamento." *Atti SIPAS 2021* – in stampa.



**CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E PROFILI DI  
ANTIMICROBICO-RESISTENZA DI CEPPI DI *STREPTOCOCCUS  
SUIS* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA NEL  
PERIODO 2013 - 2020**

**MOLECULAR CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL  
RESISTANCE PROFILES OF  
*STREPTOCOCCUS SUIS* STRAINS ISOLATED FROM FARMS IN  
NORTHERN ITALY IN 2013 - 2020**

TONNI M.<sup>1</sup>, FORMENTI N.<sup>1</sup>, GUARNERI F.<sup>1</sup>, ROMEO C.<sup>2</sup>, GUADAGNO F.<sup>1</sup>,  
SCALI F.<sup>1</sup>, ROTA NODARI S.<sup>1</sup>, BANO L.<sup>3</sup>, BACCHIN C.<sup>3</sup>, MAISANO A.M.<sup>1</sup>,  
VEZZOLI F.<sup>1</sup>, ROSIGNOLI C.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, LUPPI A.<sup>1</sup>, ZOPPI S.<sup>4</sup>,  
PASQUALI P.<sup>5</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna

<sup>2</sup> Università di Parma

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta

<sup>5</sup> Istituto Superiore di Sanità

**Parole chiave:** *Streptococcus suis*, caratterizzazione molecolare, antimicrobico-resistenza  
**Key words:** *Streptococcus suis*, molecular characterization, antimicrobial resistance

**RIASSUNTO**

Lo studio ha coinvolto 415 ceppi di *Streptococcus suis* isolati nel periodo 2013–2020 in allevamenti del Nord Italia. I ceppi sono stati testati mediante PCR per i biotipi capsulari 1, 2, 7 e 9 e per i fattori di patogenicità mrp, sly e epf. Gli stessi fattori sono stati testati con PFGE sui campioni di 4 allevamenti. La sensibilità a 11 antimicrobici è stata investigata tramite diffusione in agar. I sierotipi in ordine di prevalenza sono stati il 9 (49.7%), 2 (41.3%), 1 (4.9%) e 7 (4.2%). Sly è stato il fattore di patogenicità più frequente (85.7%), seguito da mrp (64.2%) ed epf (4.8%). Sly è stato riscontrato più frequentemente nel sierotipo 9. In 19 aziende erano disponibili almeno 4 isolati, su cui sono stati riscontrati 18 pattern di patogenicità. Solamente in 2 delle 19 è stato isolato sempre lo stesso pattern negli anni. La PFGE ha individuato un cluster prevalente nelle 4 aziende testate. I risultati suggeriscono un'elevata variabilità e una continua evoluzione. I ceppi analizzati sono risultati maggiormente sensibili ad amoxicillina + acido clavulanico (96.7%), amoxicillina (90.9%), ampicillina (78.6%), ceftiofur (77.7%) e florfenicolo (75.6%). La suscettibilità è stata costante negli anni, tuttavia, considerando le criticità italiane sull'uso degli antimicrobici, tale terapia andrebbe impiegata solo in fase emergenziale. In conclusione, la variabilità dei ceppi circolanti ne suggerisce un monitoraggio continuo, fondamentale nei casi in cui vengono utilizzati vaccini stabulogeni.

**ABSTRACT**

The study involved 415 *Streptococcus suis* strains, isolated during 2013–2020, from heavy pig farms in Northern Italy. The strains were tested with PCR for capsular biotypes (1, 2, 7, 9) and major virulence factors (mrp, sly, epf). The same virulence factors were examined with PFGE on 34 strains from four farms. Susceptibility to 11 antimicrobials was investigated by agar diffusion. Serotypes in order of prevalence were 9 (49.7%), 2 (41.3%),

1 (4.9%) and 7 (4.2%). Sly was the most common virulence factor (85.7%), followed by mrp (64.2%) and epf (4.8%). Sly was found most frequently in serotype 9. Overall, 18 patterns of pathogenicity were found in the 19 farms where, at least, four isolates were available. In two out of 19 farms a single pattern was isolated over the years. The PFGE identified one prevalent cluster in the four farms investigated. Such results suggest high variability and continuous changes of *S. suis* strains. The isolates were mostly susceptible to amoxicillin + clavulanic acid (96.7%), amoxicillin (90.9%), ampicillin (78.6%), ceftiofur (77.7%) and florfenicol (75.6%). Susceptibility has been constant over the years but, considering the well-known Italian issues regarding the overuse of antimicrobials, such therapy should only be considered when it is the only viable alternative. In conclusion, a continuous monitoring of serotypes and virulence factors is suggested by the large variability of *S. suis* strains, especially when autogenous vaccines are used.

## INTRODUZIONE

*Streptococcus suis* (*S. suis*) è considerato uno dei patogeni maggiormente rilevanti per l'economia dell'industria suinicola globale (Segura et al., 2020). La presenza di *S. suis* è stata riportata in tutto il mondo sia nell'allevamento intensivo che in quello estensivo. Inoltre, negli ultimi anni si è verificato un preoccupante aumento delle zoonosi causate da questo patogeno, soprattutto in alcune aree geografiche, testimoniato anche dall'incremento della relativa letteratura scientifica (Goyette-Desjardins et al., 2014). Il controllo delle infezioni da *S. suis* effettuato tramite l'utilizzo degli antimicrobici può avere delle implicazioni negative sull'antimicrobico-resistenza mentre sul successo della profilassi vaccinale sono riportate esperienze varie (Coursaut et al., 2020).

Ad oggi, in bibliografia sono riportati 35 sierotipi diversi di *S. suis*, tuttavia, alcuni di questi sono stati di recente tassonomicamente riclassificati dalla biologia molecolare in altre specie batteriche (Gottschalk and Segura, 2019). La classificazione sierologica si basa sulla identificazione degli antigeni capsulari (cps) specifici per ogni sierotipo. Un altro target specifico di identificazione del patogeno, da utilizzare in concomitanza con cps, per l'identificazione discriminante di *S.suis* è il gene della glutammato deidrogenasi (gdh), regione genomica molto conservata (Okwumabua et al., 2003). La caratterizzazione degli isolati, oltre che dal punto di vista del sierotipo, avviene anche tramite l'identificazione dei fattori di virulenza. I più conosciuti e studiati sono due: la sulsilina (sly), l'unica tossina prodotta da *S. suis* ed implicata anche nella adesione all'epitelio respiratorio, e la proteina rilasciata dalla muramidasi mistica (mrp) che è stata definita come "marker" di virulenza (Segura et al., 2017). Discorso a se merita la sostanza polimerica extracellulare (epf) coinvolta in molteplici meccanismi regolatori che recentemente è stata associata a meccanismi di resistenza agli antimicrobici, esacerbando quindi il fenomeno della antimicrobico-resistenza (Yi et al., 2020).

L'utilizzo di vaccini stabulogeni e la terapia antimicrobica sono i due presidi di controllo di *S.suis* a disposizione per il controllo della malattia oltre alle pratiche gestionali. Nel primo caso, per allestire la tipologia di vaccino è fondamentale conoscere il ceppo o i ceppi circolanti in allevamento (Hatrongjit et al., 2020). Tale conoscenza deve essere costantemente aggiornata per adeguare il presidio immunizzante dei ceppi vaccinali a quelli realmente circolanti in campo, selezionati dalla pressione ambientale e da quella vaccinale (Coursaut et al., 2020). Nel caso invece della terapia antimicrobica, l'efficacia della stessa è commisurata al tipo di principio attivo scelto in relazione alla sensibilità dell'isolato e alla corretta modalità di somministrazione. Secondo quanto descritto in letteratura, la sensibilità dei ceppi di *S. suis* isolati in Nord Italia non ha mostrato variazioni significative nel corso degli anni (Luppi et al., 2016).

Lo scopo del presente lavoro è quello di analizzare la prevalenza e la distribuzione dei sierotipi e dei fattori di patogenicità dei ceppi di *S. suis* circolanti in Nord Italia negli anni 2013-2020. Altro importante target del presente lavoro è quello di verificare la sensibilità ai principali antimicrobici utilizzati nella terapia della streptococcosi del suino.

## **MATERIALI E METODI**

### **Descrizione del campione**

Quattrocento-quin dici ceppi di *S. suis* sono stati isolati da altrettanti campioni patologici, cervello e polmone, di suini con forma clinica conferiti alle Sezioni Territoriali dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna durante il periodo compreso tra il 2013 e il 2020.

I ceppi isolati sono stati testati per valutare la sensibilità agli antimicrobici e successivamente sono sottoposti ad indagini di biologia molecolare al fine di caratterizzarne sia il sierotipo, e quindi ad identificare le porzioni genomiche codificanti gli antigeni capsulari, che le proteine coinvolte nei meccanismi di patogenicità.

All'interno di una strategia di controllo elaborata dal Medico Veterinario aziendale, 19 allevamenti dal 2013 al 2020 hanno conferito almeno 4 campioni da cui è stato isolato *S. suis* al fine di valutare i diversi pattern circolanti nelle diverse aziende. Nove di questi allevamenti sono stati seguiti con continuità temporale, operando un maggiore sforzo diagnostico finalizzato all'identificazione dei ceppi circolanti, utili alla formulazione di un vaccino stabulogeno. La caratterizzazione dell'intero genoma tramite PGFE è stata eseguita invece su 34 ceppi isolati da cervello provenienti da quattro allevamenti.

### **Indagini di laboratorio**

Gli isolati di *S. suis* sono stati ottenuti procedendo con la semina dei campioni patologici su terreno agar sangue con incubazione in termostato a  $37 \pm 3^\circ\text{C}$  e lettura a 24 e 48 ore. L'identificazione del genere batterico è avvenuta tramite valutazione morfologica delle colonie e successive prove di identificazione con metodi biochimici miniaturizzati Api® 20Stre.

La caratterizzazione molecolare è stata eseguita sottoponendo gli isolati batterici dapprima all'estrazione del DNA totale tramite shock termico (lisi-bollitura) e successivamente alla PCR per l'identificazione del sierotipo e dei fattori di virulenza. L'utilizzo di una PCR multiplex amplificante le aree genomiche che codificano i geni, *gdh*, *sly*, *mrp* ed *epf* come proposto da Silva e colleghi (Silva et al., 2006) ha permesso di eseguire l'attribuzione del sierotipo e l'identificazione dei fattori di patogenicità.

La PFGE è stata condotta applicando protocolli precedentemente pubblicati (Vela et al., 2003). La similarità tra i ceppi ottenuti è stata studiata impiegando il software Bionumerics versione 7.6 (Applied Maths). Tale software permette di costruire un dendrogramma sulla base delle similarità tra i pulsotipi, che viene calcolata utilizzando il Dice similarity coefficient. Come algoritmo di clustering è stato utilizzato l'UPGMA con una tolleranza e ottimizzazione dell'1,5%.

La sensibilità agli antibiotici è stata valutata tramite la metodica della diffusione in agar (CLSI\_VET, 2018) e testando un pannello di 11 molecole antimicrobiche: penicillina (P), amoxicillina (AML), ampicillina (AMP), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), cefalotina (KF), ceftiofur (EF), eritromicina (E), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT), florfenicolo (FFC), enrofloxacin (ENR). Dal 2017 al 2020 sono stati utilizzati tutti gli 11 antibiotici mentre solamente 3 di questi (AMC, EF, ENR) sono stati testati dal 2013 al 2016. L'interpretazione dell'antibiogramma secondo le regole del



CLSI VET 08 (CLSI\_VET\_08), ha consentito di classificare i ceppi di *S.suis* testati come sensibile (S), intermedio (I) o resistente (R). Nell'elaborazione dei risultati gli intermedi sono stati considerati come resistenti (Luppi et al., 2016).

### Analisi statistica

La relazione tra ciascun sierotipo (variabile dipendente) e la presenza dei relativi fattori di virulenza sly, mrp ed epf (variabili indipendenti) è stata analizzata tramite regressione logistica. La sensibilità agli antibiotici è stata calcolata in base al periodo considerato come rapporto tra il numero di isolati di *S. suis* sensibili ad un determinato antibiotico ed il numero totale di isolati testati. L'andamento della sensibilità agli antimicrobici nel tempo è stata analizzata tramite regressione logistica in cui la variabile dipendente "sensibilità/resistenza" ad un determinato antibiotico è stata messa in relazione con gli anni di studio (2013-2020), variabile indipendente.

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software SPSS 20.0 considerando statisticamente significativo il valore soglia di  $p < 0.05$ .

### RISULTATI

Anno dopo anno il numero di isolati di *S. suis* è andato progressivamente aumentando, così come il numero di ceppi isolati per allevamento conferente. I sierotipi rilevati nel corso degli anni di studio sono riportati nella Tabella 1. Seppur con percentuali diverse, quelli isolati maggiormente sono il sierotipo 2 e 9 mentre l'1 e il 7 sono stati rilevati meno frequentemente.

|             | cps1j  | cps9h  | cps2j  | cps7h |
|-------------|--------|--------|--------|-------|
| <b>2013</b> | 12,50% | 75,00% | 12,50% | 0,00% |
| <b>2014</b> | 0,00%  | 83,33% | 16,67% | 0,00% |
| <b>2015</b> | 0,00%  | 22,22% | 77,78% | 0,00% |
| <b>2016</b> | 8,33%  | 66,67% | 16,67% | 8,33% |
| <b>2017</b> | 5,88%  | 64,71% | 29,41% | 0,00% |
| <b>2018</b> | 4,00%  | 55,00% | 37,00% | 4,00% |
| <b>2019</b> | 4,17%  | 39,58% | 50,00% | 6,25% |
| <b>2020</b> | 6,10%  | 39,02% | 50,00% | 4,88% |

**Tabella 1.** Prevalenza dei sierotipi di *S. suis* nel corso degli anni 2013-2020.

**Table 1.** Prevalence of the *S. suis* serotypes during 2013-2020 years.

Nella Tabella 2 sono riportati i risultati delle indagini di caratterizzazione dei fattori di patogenicità dei ceppi isolati nei diversi anni. Considerando i due sierotipi maggiormente isolati, è stato constatato come sia più probabile rilevare isolati di sierotipo 9 con i fattori di patogenicità mrp e sly e isolati di sierotipo 2 con mrp ed epf. La distribuzione dei fattori di patogenicità per i relativi sierotipi è riportata in Tabella 3.

|      | mrp    | epf   | sly    |
|------|--------|-------|--------|
| 2013 | 29,41% | 5,88% | 29,41% |
| 2014 | 33,33% | 0,00% | 33,33% |
| 2015 | 31,25% | 6,25% | 31,25% |
| 2016 | 37,50% | 0,00% | 25,00% |
| 2017 | 34,21% | 0,00% | 34,21% |
| 2018 | 35,11% | 0,00% | 35,11% |
| 2019 | 32,76% | 1,72% | 37,93% |
| 2020 | 29,41% | 3,53% | 28,24% |

**Tabella 2.** Prevalenza dei fattori di patogenicità tra gli isolati di *S. suis* nel corso degli anni 2013-2020.

**Table 2.** Prevalence of the virulence factors of *S. suis* isolated during 2013-2020 years.

|       | mrp    | epf   | sly    |
|-------|--------|-------|--------|
| cps1j | 33,33% | 2,38% | 33,33% |
| cps9h | 35,03% | 0,00% | 34,75% |
| cps2j | 32,55% | 5,87% | 31,09% |
| cps7h | 42,11% | 0,00% | 15,79% |

**Tabella 3.** Prevalenza dei fattori di patogenicità tra gli isolati di *S. suis* in relazione al sierotipo.

**Table 3.** Prevalence of the virulence factors of *S. suis* isolated in relation to serotype

Raggruppando i campioni in studio per allevamento conferente è emerso che 19 di questi hanno fornito materiale diagnostico da cui è stato isolato *S. suis* in almeno 4 campioni nel corso degli anni. In particolare, in nove di essi è stata riscontrata una certa continuità nel tempo (A, B, C, F, G, I, K, L e Q) frutto di isolamenti multipli nel corso degli anni. Una situazione peculiare è invece quella degli allevamenti A, B, F e I che oltre ad avere una continuità temporale mostrano un andamento simile tra loro: dopo isolamenti iniziali sporadici e discontinui si è incrementato il numero di ceppi isolati per ritornare gli anni successivi ad un numero più esiguo, rispondendo ad una precisa programmazione fatta a monte.

Basandosi sui risultati forniti dalla biologia molecolare in merito a sierotipo e fattori di virulenza sono stati rilevati 18 diversi pattern di *S. suis* circolanti nei 19 allevamenti sopra menzionati (Tabella 4). In alcuni casi si può vedere la presenza di un pattern predominante come negli allevamenti L: Cps2(gdh-mrp-epf-sly) e N: Cps2(gdh-mrp-sly) aventi un unico sierotipo e relativi fattori di patogenicità costanti, negli altri allevamenti invece i diversi pattern si succedono con combinazione di sierotipi e fattori di virulenza diversi (Tabella 3). In quest'ultimo caso si possono notare aziende con pattern diversi all'interno dello stesso sierotipo ma anche pattern diversi facenti capo a sierotipi diversi.

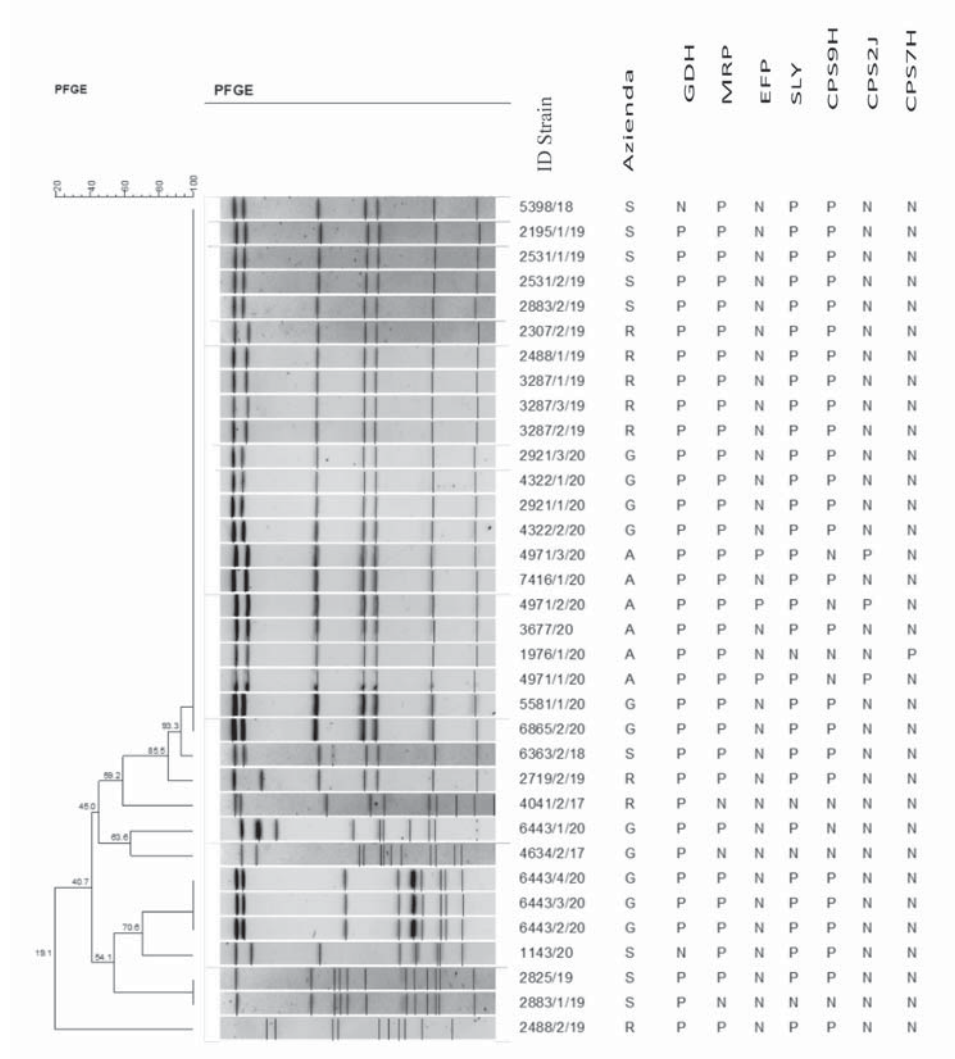
|   | Cps1(gdh-mrp-sly) | Cps2(gdh) | Cps2(gdh-mrp) | Cps2(gdh-sly) | Cps2(mrp-sly) | Cps2(gdh-mrp-sly) | Cps2(gdh-mrp-ept-sly) | Cps9(gdh) | Cps9(sly) | Cps9(gdh-sly) | Cps9(mrp-sly) | Cps9(gdh-mrp) | Cps9(gdh-mrp-sly) | Cps7(gdh)w | Cps7(mrp) | Cps7(gdh-mrp) | Cps7(gdh-sly) | Cps7(gdh-mrp-sly) |
|---|-------------------|-----------|---------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------------|-----------|-----------|---------------|---------------|---------------|-------------------|------------|-----------|---------------|---------------|-------------------|
|   | (*)               |           |               | (*)           | (*)           | (*)               | (*)                   |           | (*)       | (*)           | (*)           |               | (*)               |            |           |               | (*)           | (*)               |
| A |                   |           |               |               | 25.0          | 25.0              |                       |           |           |               |               |               | 25.0              |            |           |               | 25.0          |                   |
| B |                   | 11.1      |               |               |               |                   |                       |           |           |               | 11.1          |               | 77.8              |            |           |               |               |                   |
| C |                   |           |               |               |               | 11.1              |                       |           |           |               | 33.1          |               | 55.6              |            |           |               |               |                   |
| D |                   |           |               |               |               | 57.1              | 14.3                  |           |           |               |               |               | 28.6              |            |           |               |               |                   |
| E |                   |           |               |               |               | 37.5              |                       |           | 12.5      | 25.0          |               |               | 25.0              |            |           |               |               |                   |
| F |                   |           |               |               |               | 50.0              |                       |           |           |               | 25.0          |               | 25.0              |            |           |               |               |                   |
| G |                   |           |               |               |               | 50.0              |                       |           |           |               |               |               | 50.0              |            |           |               |               |                   |
| H |                   |           | 33.3          |               |               |                   |                       |           |           |               | 22.1          |               | 33.3              |            |           |               |               | 11.2              |
| I |                   |           |               |               |               |                   | 42.8                  |           |           |               |               | 14.3          | 28.6              |            |           | 14.3          |               |                   |
| J |                   |           |               |               |               |                   |                       |           |           |               |               |               | 100               |            |           |               |               |                   |
| K |                   |           |               |               |               | 37.5              | 12.5                  |           |           |               |               |               | 50.0              |            |           |               |               |                   |
| L |                   |           |               |               |               |                   | 100                   |           |           |               |               |               |                   |            |           |               |               |                   |
| M |                   |           |               |               |               |                   |                       |           |           |               | 25.0          |               | 75.0              |            |           |               |               |                   |
| N |                   |           |               |               |               | 100               |                       |           |           |               |               |               |                   |            |           |               |               |                   |
| O |                   |           |               |               |               | 16.7              |                       |           |           |               |               |               | 83.3              |            |           |               |               |                   |
| P |                   |           |               |               |               |                   |                       |           |           |               | 66.7          |               |                   | 33.3       |           |               |               |                   |
| Q | 21.4              |           |               |               |               | 57.2              |                       |           |           |               |               |               | 14.3              |            | 7.1       |               |               |                   |
| R | 9.0               |           |               |               | 36.4          | 54.6              |                       |           |           |               |               |               |                   |            |           |               |               |                   |
| S |                   |           |               | 62.5          |               |                   |                       | 25.0      |           |               |               |               |                   |            | 12.5      |               |               |                   |

**Tabella 4.** Pattern circolanti e relativa frequenza negli allevamenti con almeno 4 isolamenti di *S. suis* negli anni di studio. Con l'asterisco (\*) sono indicati i pattern che includevano la tossina sly.

**Table 4.** Pattern and frequency of *S. suis* isolated in farms with at least 4 isolation during the time of study.

With the asterisk (\*) the patterns that included the toxin (sly).

I risultati della PFGE evidenziano un cluster clonale (similarità del 100%) in cui si collocano 22 dei 34 ceppi analizzati, isolati dai 4 allevamenti indagati, in anni diversi (figura 1). Diciassette di questi presentano anche lo stesso pattern di virulenza. Inoltre, i ceppi isolati dal cervello di soggetti diversi di uno stesso allevamento, in uno stesso momento si sono dimostrati cloni.



**Figura 1.** Dendrogramma originato dai profili PFGE (SmaI) di 34 *S. suis* isolati da casi clinici in 4 diversi allevamenti (S, A, G, R).

**Figure 1.** Tree showing the similarities between PFGE patterns (SmaI) of 34 *S. suis* isolated from clinical cases in 4 different farms (S, A, G, R).

Il test di antimicrobico-suscettibilità ai più comuni antimicrobici (Tabella 5) ha rivelato una percentuale di sensibilità molto alta dei ceppi testati verso la AML, che arriva al 96.7% se in associazione con l'acido clavulanico (AMC). Percentuali di sensibilità di ben oltre il 70% dei ceppi testati anche verso AMP, EF e FFC, appena sotto sono risultati invece P e KF. L'aggiornamento del pannello di antibiotici utilizzati ha impedito che il numero di ceppi testati verso i vari antimicrobici fosse costante, ad eccezione della AML che è stata testata nella maggior parte dei casi in associazione all'acido clavulanico, meno in formulazione singola. L'analisi statistica ha evidenziato che la sensibilità dei ceppi di *S. suis* verso i singoli antibiotici è rimasta invariata nel corso degli anni in studio ( $p > 0.05$ ).

| Antimicrobico                    | Abbreviazione | Ceppi testati | Sensibilità |
|----------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| Amoxicillina + Acido Clavulanico | AMC           | 330           | 96.7%       |
| Amoxicillina                     | AML           | 66            | 90.9%       |
| Ampicillina                      | AMP           | 266           | 78.6%       |
| Ceftiofur                        | EF            | 332           | 77.7%       |
| Florfenicolo                     | FFC           | 299           | 75.6%       |
| Penicillina                      | P             | 266           | 67.3%       |
| Cefalotina                       | KF            | 127           | 64.6%       |
| Trimetoprim + Sulfonamidi        | SXT           | 266           | 45.1%       |
| Enrofloxacin                     | ENR           | 332           | 42.8%       |
| Eritromicina                     | E             | 266           | 9.0%        |
| Tetraciclina                     | TE            | 266           | 3.8%        |

**Tabella 5.** Numero di ceppi di *S.suis* considerati e relativa percentuale di sensibilità agli antibiotici testati.

**Table 5.** Number of *S.suis* strains and antimicrobial susceptibility.

## DISCUSSIONE

I risultati hanno evidenziato come i sierotipi maggiormente isolati siano stati il 2 ed il 9. Questo dato è in linea con quanto rilevato a livello internazionale, soprattutto se si considera che il sierotipo 2 è quello da sempre maggiormente diffuso a livello mondiale (Goyette-Desjardins et al., 2014) e che il sierotipo 9 ha assunto negli ultimi anni un maggior rilievo (Willemse et al., 2019). Quest'ultimo è stato oggetto di approfonditi studi genomici (Segura et al., 2020) che hanno evidenziato come i cloni responsabili di manifestazioni cliniche siano molto simili tra loro, a differenza di quelli rilevati in suini asintomatici che hanno caratteristiche genomiche più eterogenee.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dei fattori di patogenicità è stato evidenziato che mentre *mrp* e *sly* sono state rilevate in modo omogeneo negli anni di studio, *epf* è stata rilevata solo in sporadici casi. Per contro non è stata osservata alcuna associazione tra i ceppi che esprimevano questo fattore di virulenza e la resistenza ad alcune classi di antibiotici, nonostante in bibliografia siano stati attribuiti fenomeni di antimicrobico-resistenza proprio a *epf* (Yi et al., 2020).

Le associazioni rilevate con maggior frequenza sono state: ceppi di *S. suis* sierotipo 9 che esprimono *mrp* e *sly* e ceppi di sierotipo 2 caratterizzati da *mrp* ed *epf*. Va sottolineato che *sly* risulta associata più frequentemente al sierotipo 9, a differenza di quanto riportato da altri autori che descrivono invece *sly* associata al sierotipo 2 (Segura et al., 2020). Ciò non stupisce se consideriamo che nei Paesi Bassi e nell'est Europa si è assistito negli ultimi anni ad un notevole aumento degli isolamenti di *S. suis* sierotipo 9, in particolar modo per quelli ad alta virulenza (Willemse et al., 2019), a conferma del fatto che questo sierotipo sta assumendo sempre più un ruolo di interesse. Va comunque ricordato che l'identificazione dei fattori di patogenicità, per ora, non può essere considerato come discriminante sull'effettivo risolto clinico in campo di un determinato ceppo (Segura et al., 2020). L'espressione di tali fattori di patogenicità ha mostrato una distribuzione pressoché omogenea di *mrp* e *sly* nel corso degli anni in linea con quanto presente nella letteratura internazionale (Segura et al., 2017).

La combinazione di sierotipo e fattori di patogenicità ci ha portato ad identificare

diversi pattern di *S. suis*. Focalizzandosi sui singoli allevamenti che hanno effettuato un monitoraggio costante nel corso degli anni, i pattern rilevati sono risultati diversi e variabili, mostrando di fatto un equilibrio dinamico, che come già riportato in letteratura (Segura et al., 2020) necessita di essere seguito nel tempo. A conferma di questo sono anche i risultati di caratterizzazione genetica attraverso PFGE, che garantiscono un ulteriore step nella identificazione dei pattern presenti. Infatti i dati ottenuti dai 4 allevamenti in cui è stata eseguita anche questa analisi, mostrano un unico cluster clonale con diversi pattern di virulenza, in particolare i cloni isolati da soggetti aventi una clinica rilevante sono stati quelli dotati di tutti e tre i fattori di virulenza.

È emerso quindi che al fine di avere un quadro completo dei diversi pattern circolanti e controllare la malattia in un allevamento (anche attraverso l'utilizzo di vaccini stabulogeni), risulta importante conoscere la dinamica di circolazione dei diversi ceppi attraverso l'esecuzione di più isolamenti nel corso del tempo e la loro caratterizzazione. Tale caratterizzazione si realizza con l'identificazione dei pattern circolanti mediante metodica PCR e/o PFGE.

Per quanto riguarda la sensibilità dei ceppi di *S. suis* verso gli antibiotici considerati non sono state rilevate differenze statisticamente significative nel periodo di studio, confermando quanto rilevato nella decade precedente (2004-2014) (Luppi et al., 2016). Se osserviamo il dato complessivo dei ceppi testati nel corso degli anni, è emerso come AML, AMP, EF e FFC siano le molecole a cui *S. suis* risulta essere maggiormente sensibile, confermando il ruolo fondamentale di tali principi attivi per la terapia antimicrobica della streptococchi suina. Tuttavia, questi dati devono essere soppesati nel contesto della logica “One Health” in cui alcune molecole ricoprono un ruolo prioritario nelle terapie umane. Inoltre, si rammenta come già alcune molecole (EF), rientrino in una categoria di antimicrobici il cui utilizzo deve essere razionalizzato e basato sui risultati di un test di sensibilità (Commission, 2015). A fronte di un ampio ventaglio di molecole idonee al trattamento antibiotico, questa soluzione deve essere contemplata unicamente come terapia riparatoria e non utilizzata nella quotidiana gestione aziendale.

Il management aziendale e la profilassi rappresentano la vera sfida moderna per il controllo delle infezioni da *S. suis* (Correa-Fiz et al., 2020). L'utilizzo degli antibiotici rimane giustificato dall'efficacia del trattamento per la risoluzione delle forme cliniche gravi e dalla sensibilità che storicamente *S. suis* ha dimostrato verso le sopracitate classi di antimicrobici. È importante tuttavia, considerare il tema della farmaco-suscettibilità in quanto, seppur in Italia nel recente passato (Luppi et al., 2016) e nel nostro lavoro si è dimostrata costante, a livello mondiale viene riportata la progressiva diminuzione della sensibilità agli antimicrobici (Segura et al., 2020).

Le esperienze di altri paesi Europei hanno insegnato che controllare *S. suis* senza l'utilizzo di antimicrobici è difficile ma possibile. A tale fine è fondamentale l'applicazione di adeguate misure di management aziendale, l'utilizzo di additivi con azione diretta sul microbiota intestinale/nasale (Correa-Fiz et al., 2020) e l'impiego di vaccini stabulogeni (Hatrongjit et al., 2020). Seppur i dati scientifici relativi alla pratica vaccinale siano limitati, diversi studi hanno dimostrato che l'efficacia è prima di tutto influenzata dall'individuazione corretta dei pattern presenti nell'allevamento mediante più isolamenti nel corso del tempo (Coursaut et al., 2020; Segura et al., 2020).

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha rilevato una notevole variabilità in termini di sierotipi circolanti di *S. suis* e dei relativi fattori di virulenza. I sierotipi 2 e 9 sono quelli isolati più di frequente e tra questi il sierotipo 9 esprime più spesso la tossina sly. I pattern più frequenti sono



risultati essere Cps2(gdh-mrp-sly) e Cps9(gdh-mrp-sly). Il pannello di sensibilità agli antimicrobici si è mostrato stabile nel tempo.

Il controllo della streptococcosi del suino non può prescindere da un adeguata strategia di management aziendale e deve prevedere, la valutazione di tecniche alternative fra le quali l'utilizzo di vaccini stabulogeni, oltre all'utilizzo degli antimicrobici per le forme cliniche gravi. Poiché il successo di tale vaccinazione è basata sulla corrispondenza tra ceppi circolanti e ceppi vaccinali, la determinazione dei pattern circolanti attraverso indagini di biologia molecolare risulta essere uno strumento basilare e di primaria importanza per il controllo della malattia. Il costante monitoraggio dei ceppi circolanti negli allevamenti ove vengono utilizzati tecniche immunizzanti consentirà un riscontro in merito alla loro efficacia e permetterà di conoscere meglio la dinamica di circolazione all'interno dei singoli allevamenti.

## BIBLIOGRAFIA

1. CLSI\_VET, 2018, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition. Ed., Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
2. CLSI\_VET\_08, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. Ed. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
3. Commission, E., 2015, Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine (2015/C-299/04): Official Journal of the Euran Union, p. 1-20.
4. Correa-Fiz, F., C. Neila-Ibáñez, S. López-Soria, S. Napp, B. Martinez, L. Sobrevia, S. Tibble, V. Aragon, and L. Migura-Garcia, 2020, Feed additives for the control of post-weaning *Streptococcus suis* disease and the effect on the faecal and nasal microbiota: Sci Rep, v. 10, p. 20354.
5. Corsaut, L., M. Misener, P. Canning, G. Beauchamp, M. Gottschalk, and M. Segura, 2020, Field Study on the Immunological Response and Protective Effect of a Licensed Autogenous Vaccine to Control *Streptococcus suis* Infections in Post-Weaned Piglets: Vaccines (Basel), v. 8.
6. Gottschalk, M., and M. Segura, 2019, Diseases of Swine: Hoboken, NJ, USA., Wiley-Blackwell, 934-950 p.
7. Goyette-Desjardins, G., J. P. Auger, J. Xu, M. Segura, and M. Gottschalk, 2014, *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent-an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing: Emerg Microbes Infect, v. 3, p. e45.
8. Hatrongjit, R., N. Fittipaldi, M. Gottschalk, and A. Kerdsin, 2020, Tools for Molecular Epidemiology of *Streptococcus suis*: Pathogens, v. 9.
9. Luppi, A., P. Bonilauri, G. Maioli, Y. Gherpelli, and M. Dottori, 2016, Resistenza agli antibiotici in ceppi di *Streptococcus suis* isolati nel suino nel periodo 2004-2014: XLII Meeting Annuale, p. 133-137.
10. Okwumabua, O., M. O'Connor, and E. Shull, 2003, A polymerase chain reaction (PCR) assay specific for *Streptococcus suis* based on the gene encoding the glutamate dehydrogenase: FEMS Microbiol Lett, v. 218, p. 79-84.
11. Segura, M., V. Aragon, S. L. Brockmeier, C. Gebhart, A. Greeff, A. Kerdsin, M. A. O'Dea, M. Okura, M. Saléry, C. Schultsz, P. Valentin-Weigand, L. A. Weinert, J. M. Wells, and M. Gottschalk, 2020, Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*: Pathogens, v. 9.

12. Segura, M., N. Fittipaldi, C. Calzas, and M. Gottschalk, 2017, Critical *Streptococcus suis* Virulence Factors: Are They All Really Critical?: *Trends Microbiol*, v. 25, p. 585-599.
13. Silva, L. M., C. G. Baums, T. Rehm, H. J. Wisselink, R. Goethe, and P. Valentin-Weigand, 2006, Virulence-associated gene profiling of *Streptococcus suis* isolates by PCR: *Vet Microbiol*, v. 115, p. 117-27.
14. Vela, A. I., J. Goyache, C. Tarradas, I. Luque, A. Mateos, M. A. Moreno, C. Borge, J. A. Perea, L. Domínguez, and J. F. Fernández-Garayzábal, 2003, Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis: *J Clin Microbiol*, v. 41, p. 2498-502.
15. Willemse, N., K. C. H. van der Ark, N. Stockhofe-Zurwieden, H. Smith, D. I. Picavet, C. van Solt-Smits, H. J. Wisselink, C. Schultsz, and A. de Greeff, 2019, Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations: *Sci Rep*, v. 9, p. 15429.
16. Yi, L., M. Jin, J. Li, D. Grenier, and Y. Wang, 2020, Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Streptococcus suis*: *Appl Microbiol Biotechnol*, v. 104, p. 8649-8660.



# DOSI NUTRIZIONALI DI ZINCO MODULANO L'ESPRESSIONE GENICA DEI FATTORI DI VIRULENZA DI *ESCHERICHIA COLI* K88

## NUTRITIONAL ZINC DOSES MODULATE GENE EXPRESSION OF *ESCHERICHIA COLI* K88 VIRULENCE FACTORS

BONETTI A.<sup>1</sup>, TUGNOLI B.<sup>2</sup>, PIVA A.<sup>1,2</sup>, GRILLI E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,  
Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia

<sup>2</sup>Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia

<sup>3</sup>Vetagro Inc., 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, 60604, Chicago, IL, USA

**Parole chiave:** *Escherichia coli* K88, antibiotici, zinco

**Key Words:** *Escherichia coli* K88, antibiotics, zinc

### RIASSUNTO

La minaccia rappresentata dall'antibiotico resistenza richiede l'utilizzo di metodi alternativi per gestire infezioni legate a patogeni come *Escherichia coli* K88, principale agente eziologico della diarrea post-svezzamento del suino. Lo zinco ossido è impiegato a livelli farmacologici per migliorare le performance e l'integrità intestinale allo svezzamento, tuttavia l'inquinamento ambientale derivante dal suo uso desta una crescente preoccupazione. Considerando i futuri requisiti legislativi, che impediranno l'uso dello zinco a scopo farmacologico, questo studio ha valutato l'attività inibente la crescita batterica di antibiotici convenzionali e varie forme di zinco, unitamente alla loro capacità di modulare la virulenza di *E. coli* K88. I risultati dimostrano come il ceppo testato di *E. coli* K88 sia resistente alla maggior parte degli antibiotici esaminati; tra le forme di zinco, solo ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> e Zn-Met mostrano attività antimicrobica a 2000 ppm. ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> e ZnCl<sub>2</sub> hanno aumentato – a una dose di zinco equivalente pari a 65 ppm – l'espressione dei fattori di virulenza di *E. coli* K88. In conclusione, questo studio ha dimostrato che concentrazioni farmacologiche di varie forme di Zn possono esercitare un effetto antimicrobico solo a 2000 ppm, mentre il loro impiego a dosaggi nutrizionali comporta, in ogni modo, una modulazione significativa dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

### ABSTRACT

The threat represented by antibiotic resistance is more and more requiring the identification of alternative methods to manage infections exerted by pathogens such as *Escherichia coli* K88, the main determining agent of piglets' post-weaning diarrhea. Pharmacological levels of zinc oxide are usually employed for their capacity to improve growth performance and intestinal integrity at weaning. However, the environmental pollution exerted by ZnO is raising concerns. Considering future legislative requirements, which will forbid the usage of zinc for pharmacological purposes, this study evaluated the antimicrobial activity of conventional antibiotics and several zinc forms, and their ability to modulate the *E. coli* K88 virulence gene expression. Results demonstrate how the *E. coli* K88 tested strain is resistant to most of the tested antibiotics; amongst zinc forms, only ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> and Zn-Met show an antimicrobial activity at 2000 ppm. ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> and ZnCl<sub>2</sub> – at doses providing 65 ppm of Zn – increased

the expression of *E. coli* K88 virulence factors. In conclusion, this study demonstrated the capacity of pharmacological doses of various Zn forms to exert an antimicrobial effect only at 2000 ppm, while their utilization at nutritional levels produces a significant modulation of virulence genes of *E. coli* K88.

## INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento rappresenta una delle principali sfide dell'industria suina mondiale. Tale condizione patologica è primariamente causata da *Escherichia coli* K88, un patogeno appartenente alla classe degli *E. coli* enterotossigenici (ETEC) (Croxen *et al.*, 2013), che comporta importanti perdite economiche per gli allevatori a causa di costi per le terapie, ridotta crescita degli animali e mortalità (Jayaraman and Nyachoti, 2017). L'azione patogenica di *E. coli* K88 viene esercitata mediante i suoi fattori di virulenza. L'attacco del batterio avviene mediante adesine fimbriali che legano recettori posti sulla superficie degli enterociti; tale legame stimola la produzione delle enterotossine proteiche termolabili (LT) e termostabili (STa ed STb). Le tre tossine, interagendo con i loro rispettivi recettori, pur attivando vie di segnalazione differenti, comportano l'apertura di canali per l'escrezione del cloro e l'inibizione di proteine per il riassorbimento del sodio. Ciò produce uno squilibrio ionico che, richiamando acqua nel lume intestinale, genera il sintomo diarroico.

Gli antibiotici rappresentano l'approccio principalmente impiegato per combattere gli stati di colibacillosi. Tuttavia, l'insorgenza e la rapida diffusione della resistenza microbica agli antibiotici hanno spinto scienziati e istituzioni politiche a promuovere azioni volte alla riduzione del loro uso.

L'utilizzo di minerali a scopo antimicrobico è una pratica ampiamente consolidata in suinicoltura (Poulsen, 1995). L'impiego di dosi farmacologiche di zinco ossido (ZnO) allo svezzamento può ridurre l'insorgenza della diarrea, migliorare le performance di crescita e modulare l'architettura e lo stato infiammatorio intestinale (Grilli *et al.*, 2015). Ciò nonostante, l'utilizzo di elevati livelli di questo elemento ha sollevato preoccupazioni riguardanti l'inquinamento ambientale. Per questo motivo, le autorità europee hanno imposto una completa eliminazione di livelli farmacologici di ZnO dal 2022.

Scopo di questo studio è stato quello di valutare la suscettibilità di un ceppo di *E. coli* K88 verso alcuni degli antibiotici più utilizzati in allevamento animale e diverse forme di Zn. Inoltre, in ottemperanza ai futuri requisiti legislativi, è stata analizzata la capacità delle stesse forme di Zn, a livelli nutrizionali, di modulare l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

## MATERIALI E METODI

Il batterio utilizzato in questo studio è un ceppo di campo di *Escherichia coli* K88, originariamente isolato dall'intestino di un suinetto sintomatico.

**Antibiogramma.** Mediante l'approccio MIC (concentrazione minima inibente), è stata valutata la suscettibilità del ceppo a 7 antibiotici (amoxicillina, ampicillina, doxiciclina, lincomicina, neomicina, penicillina G e colistina), le cui soluzioni stock sono state preparate in infuso cuore-cervello (BHI). Il saggio, allestito in piastre 96-well, ha previsto la diluizione degli antibiotici in BHI alle concentrazioni di interesse, l'inoculo del ceppo a una concentrazione di  $10^5$  CFU/mL, quindi l'incubazione in aerobiosi a +37°C per 24 ore. Ogni piastra, preparata in duplicato, conteneva sia controlli positivi (solo BHI con ceppo) che bianchi (solo BHI). Trascorso il periodo di incubazione, è stata misurata allo spettrofotometro l'assorbanza di ogni piastra a 630 nm. Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire una assorbanza nulla

dopo 24 ore di incubazione.

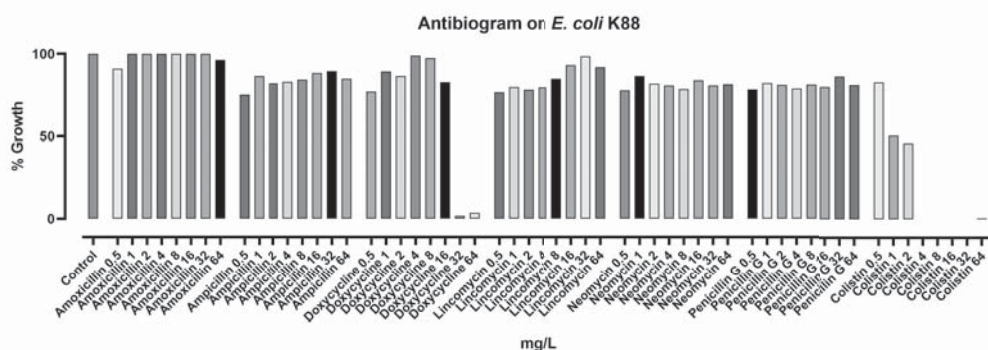
*Attività antimicrobica di diverse forme di Zn.* Con lo stesso metodo, è stata determinata l'attività antimicrobica verso *E. coli* K88 di 4 forme di Zn, le cui soluzioni stock sono state preparate in acqua ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  e Zn-Met) o 5% acido acetico (ZnO, nano-ZnO). Il saggio, allestito in tubi, ha previsto la diluizione delle soluzioni stock delle varie forme di Zn in terreno di coltura BHI alle concentrazioni di interesse, l'inoculo del ceppo alla concentrazione di  $10^5$  CFU/mL, quindi l'incubazione dei tubi in aerobiosi a  $+37^\circ\text{C}$  per 24 ore. Tra i tubi, preparati in triplicato, sono stati aggiunti sia controlli positivi (BHI con ceppo, BHI + 5% acido acetico con ceppo) che bianchi (solo BHI). Trascorso il periodo di incubazione, 10  $\mu\text{L}$  del contenuto di ogni tubo sono stati seminati su piastre BHI Agar. Per ogni forma di Zn, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa di sostanza in grado di impedire la crescita di colonie in seguito a semina e incubazione per 24 ore su piastra BHI Agar.

*Modulazione dei geni di virulenza di K88 da parte di diverse forme di Zn.* Per valutare la capacità di diverse forme di Zn di modulare l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88,  $10^6$  CFU sono stati inoculati in 5 mL di BHI supplementato con differenti forme di Zn ( $\text{ZnO}$ , nano-ZnO,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{ZnCl}_2$  e Zn-Met) a una concentrazione tale da fornire 65 ppm di Zn (equivalenti a 80.90 ppm di ZnO e nano-ZnO, 181.97 ppm di  $\text{ZnSO}_4$ , 135.50 ppm di  $\text{ZnCl}_2$  e 212.36 ppm di Zn-Met). Ogni concentrazione è stata valutata in triplicato, oltre all'aggiunta di controlli adeguati (solo BHI, BHI con ceppo, BHI + 5% acido acetico con ceppo). In seguito a 4 ore di incubazione in aerobiosi a  $+37^\circ\text{C}$ , è stato estratto l'RNA totale mediante il kit NucleoSpin® RNA Kit (Macherey-Nagel), seguendo le istruzioni del produttore. In seguito alla misurazione allo spettrofotometro della resa e della qualità dell'RNA estratto, è stata eseguita la retrotrascrizione dell'RNA in cDNA mediante iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), come da istruzioni fornite dal produttore. La real-time PCR è stata realizzata utilizzando CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) e iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Le reazioni sono state preparate in un volume finale di 10  $\mu\text{L}$ , contenenti 5  $\mu\text{L}$  di 2x iTaq Universal SYBR mix, 200 o 600 nM di ogni primer (Tabella 1), 10 ng di cDNA e acqua nucleasi-free per portare a volume. Il protocollo di PCR ha previsto 3 minuti a  $95^\circ\text{C}$ , seguito da 40 cicli di 10 secondi a  $95^\circ\text{C}$  e 30 secondi a  $60^\circ\text{C}$ . La specificità della PCR è stata determinata mediante una curva di melting (da 55 a  $95^\circ\text{C}$  con un incremento di temperatura pari a  $0.5^\circ\text{C/s}$ ). L'analisi di espressione genica, normalizzata rispetto ai due geni reference *rrsA* e *ihfB*, ha previsto l'utilizzo del metodo  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

*Analisi statistica.* Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism®. Per i risultati della gene expression, è stato applicato il test ANOVA a una via, seguito dal Turkey post-test, per comparare i trattamenti con il rispettivo controllo. Le differenze significative sono indicate dagli asterischi: \* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0.001$ .

## RISULTATI

*Antibiogramma.* I risultati dell'antibiogramma condotto su *E. coli* K88 sono mostrati in Figura 1. Il batterio in esame si è mostrato resistente a tutte le concentrazioni testate (0.5 ppm – 64 ppm) di amoxicillina, ampicillina, lincomicina, penicillina G e neomicina. Tuttavia, la crescita batterica è stata inibita dalla doxiciclina alle concentrazioni di 32 e 64 ppm, mentre la colistina si è dimostrata capace di prevenire la proliferazione batterica già alla concentrazione di 4 ppm.



**Figura 1** - Crescita di *E. coli* K88, espresso come % rispetto al controllo (solo ceppo), quando coltivato con differenti concentrazioni in ppm di amoxicillina, ampicillina, doxiciclina e lincomicina, neomicina, penicillina G e colistina.

**Figure 1** - *E. coli* K88 growth, expressed as % compared to control (strain only), when cultured with different concentrations in ppm of amoxicillin, ampicillin, doxycycline, lincomycin, neomycin, penicillin G and colistin.

*Attività antimicrobica di diverse forme di Zn.* I risultati delle MIC su *Escherichia coli* K88 trattato con quattro differenti forme di Zn hanno dimostrato che ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> e Zn-Met sono capaci di inibire la crescita batterica alla dose più alta (2000 ppm), mentre le concentrazioni inferiori hanno consentito la crescita di *E. coli* K88. Nessuna attività inibitoria è stata registrata per ZnCl<sub>2</sub>.

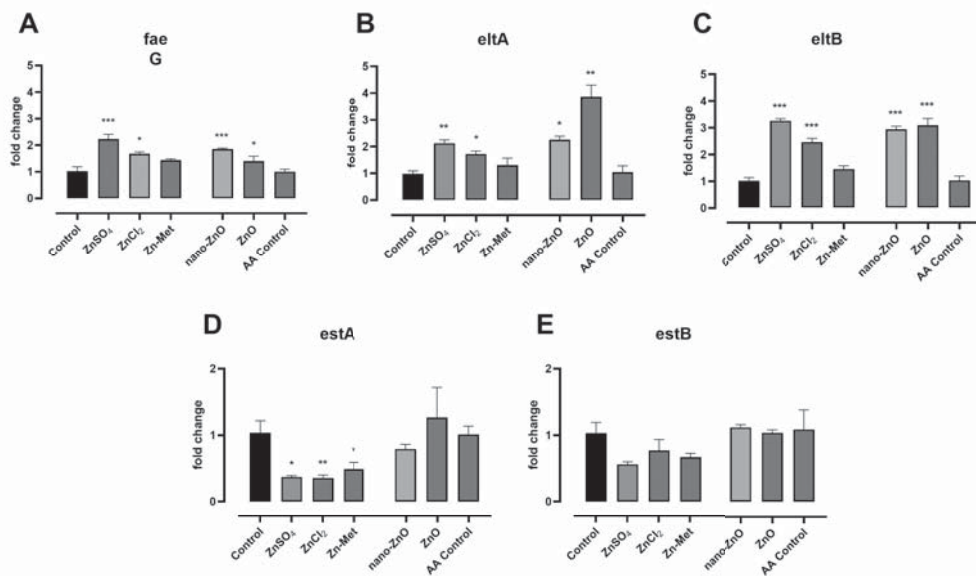
*Modulazione dei geni di virulenza di K88 da parte di diverse forme di Zn.* I risultati della modulazione dell'espressione genica dei fattori di virulenza di *E. coli* K88 esercitati da diverse forme di Zn sono presentati in Figura 2. In generale, si evidenzia la capacità di quasi tutte le forme di Zn di modulare l'espressione dei geni di virulenza del patogeno in esame, anche se impiegate a una concentrazione equivalente di 65 ppm, notevolmente inferiore alle dosi farmacologiche.

Per quanto riguarda le capacità adesive di *E. coli* K88, ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZnO e nano-ZnO mostrano una significativa capacità di incrementare l'espressione del gene *faeG*, codificante per la subunità maggiore delle diverse varianti delle adesine fimbriali, aumento non registrato con l'utilizzo della Zn-Met (Figura 2A).

L'espressione della tossina termolabile LT viene notevolmente incrementata dall'incubazione di *E. coli* K88 con ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, ZnO e nano-ZnO (P<0.001), mentre l'utilizzo di Zn-Met non comporta un aumento apprezzabile dell'espressione dei geni *eltA* ed *eltB*, codificanti le due subunità della tossina in esame (Figure 2B e 2C).

Mentre i livelli di mRNA della proteina STb non sono influenzati in maniera rilevante da nessuno dei trattamenti (Figura 2E), l'espressione della tossina STa viene significativamente ridotta dall'aggiunta, nel medium di coltura di *E. coli* K88, di ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e Zn-Met (Figura 2D).





**Figura 2** - Analisi gene expression dei geni di virulenza di *E. coli* K88 incubato con differenti forme di Zn in grado di fornire 65 ppm di Zn. I dati sono presentati come media (n = 3) e la SEM è rappresentata dalle barre verticali. Gli asterischi indicano una differenza significativa: \* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0.001$ . Le differenze sono calcolate tra ogni trattamento e il rispettivo controllo: ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e Zn-Met verso controllo; nano-ZnO e ZnO verso controllo AA.

**Figure 2** - Gene expression analysis of *E. coli* K88 incubated with different zinc sources providing 65 ppm of Zn. Data are presented as means (n = 3) and SEM represented by vertical bars. Asterisks indicate statistically significant differences: \* =  $P \leq 0.05$ ; \*\* =  $P \leq 0.01$ ; \*\*\* =  $P \leq 0.001$ . Differences are calculated between each treatment and the respective control: ZnSO<sub>4</sub>, ZnCl<sub>2</sub> e Zn-Met versus control; nano-ZnO and ZnO versus AA control.

## DISCUSSIONE

In questo studio, un ceppo di *E. coli* K88 è stato testato contro diversi antibiotici: il batterio è risultato resistente ad amoxicillina, ampicillina, neomicina, lincomicina e penicillina G. Pur essendo ancora sensibile alla doxiciclina, il dato della MIC (32 ppm) mostra in *E. coli* K88 una preoccupante propagazione dei geni di resistenza. Tali osservazioni sono confermate da ulteriori studi che hanno provato una problematica riduzione della sensibilità di numerosi ceppi di *E. coli* agli antibiotici (Choi *et al.*, 2002; Klein *et al.*, 2015; van Breda, Dhungyel and Ward, 2018).

La colistina è uno degli antimicrobici autorizzati all'utilizzo sia in campo animale che umano. Il suo uso in suinocoltura aiuta la gestione delle infezioni da *E. coli* in maniera efficace, come dimostrato dai nostri risultati: il ceppo testato ha mostrato sensibilità alla colistina (MIC a 4 ppm). Tuttavia, la comparsa del gene di resistenza *mcr-1* rappresenta una seria minaccia all'efficacia di un antibiotico utile anche in medicina umana; si rende quindi necessario valutare ulteriori strategie (Rhouma *et al.*, 2016).

Tra gli approcci alternativi per combattere la diarrea post-svezzamento del suino vi è l'impiego di livelli farmacologici di Zn. In questo studio, la MIC contro *E. coli* K88 è stata riscontrata a 2000 ppm per ZnO, nano-ZnO, ZnSO<sub>4</sub> e Zn-Met, mentre non è stato possibile osservare una inibizione della crescita microbica alle concentrazioni testate di ZnCl<sub>2</sub>. In generale, i risultati delle MIC non dimostrano una attività antimicrobica ampia contro *E. coli* K88 per nessuna delle forme di Zn valutate.

Dal 2022, l'utilizzo dello Zn sarà consentito nell'Unione Europea solamente a livelli nutrizionali, in quanto le autorità competenti hanno imposto un totale divieto sulla commercializzazione di prodotti contenenti Zn a scopo terapeutico. Secondo il Regolamento (CE) N. 1334/2003, il limite d'uso è fissato a 150 ppm per il suino. Considerando tale limite, il presente studio ha voluto valutare la capacità di dosi nutrizionali di Zn – inferiori al requisito legislativo e non efficaci dal punto di vista antimicrobico – di modulare l'espressione di geni di virulenza e patogenicità di *E. coli* K88 e come questa attività potesse essere influenzata dalla diversa forma di Zn.

In generale, si osserva che le varie forme di Zn tendono a promuovere l'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88. In effetti, lo Zn è uno degli ioni essenziali per la sopravvivenza e il metabolismo di *E. coli*, poiché parte di una molteplicità di proteine ed enzimi. L'aggiunta ulteriore di Zn nella dieta potrebbe, quindi, facilitarne l'assunzione ed utilizzo da parte dei batteri, favorendone il metabolismo e l'acquisizione di un fenotipo particolarmente virulento come conseguenza della maggiore attività degli enzimi, tra cui le polimerasi della trascrizione genica (Hantke, 2005).

## CONCLUSIONI

Questo studio ha osservato la resistenza di un ceppo di campo di *E. coli* K88 – principale responsabile dell'insorgenza della diarrea post-svezzamento del suino – a diversi antibiotici, confermando come l'antibiotico-resistenza rappresenti una seria minaccia per la gestione delle infezioni batteriche. L'utilizzo di varie forme di Zn non esercita un effetto antimicrobico su *E. coli* K88, se non limitatamente alle dosi farmacologiche (2000 ppm). I futuri requisiti legislativi europei proibiranno l'impiego di tali concentrazioni di Zn: l'uso di livelli nutrizionali di questo minerale – pari a 65 ppm di Zn equivalente, al di sotto del tetto fissato di 150 ppm – dimostra come possa comunque esistere, da parte dei composti dello Zn, un'azione modulatoria sull'espressione dei geni di virulenza di *E. coli* K88.

## BIBLIOGRAFIA

1. van Breda, L. K., Dhungyel, O. P. and Ward, M. P. (2018) "Antibiotic resistant *Escherichia coli* in southeastern Australian pig herds and implications for surveillance", *Zoonoses and Public Health*, 65, pp. e1–e7.
2. Choi, C. *et al.* (2002) "Antimicrobial susceptibility of pathogenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Korea", *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, pp. 71–73.
3. Croxen, M. A. *et al.* (2013) "Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*", *Clinical Microbiology Reviews*, 26, pp. 822–880.
4. Grilli, E. *et al.* (2015) "Low doses of microencapsulated zinc oxide improve performance and modulate the ileum architecture, inflammatory cytokines and tight junctions expression of weaned pigs", *Animal*, 9, pp. 1760–1768.
5. Hantke, K. (2005) "Bacterial zinc uptake and regulators", *Current Opinion in Microbiology*, 8, pp. 196–202.
6. Jayaraman, B. and Nyachoti, C. M. (2017) "Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review.", *Animal nutrition*, 3, pp. 205–211.

7. Klein, U. *et al.* (2015) “Antimicrobial susceptibility monitoring of respiratory and enteric tract pathogens isolated from diseased pigs across Europe between 2009 and 2012”, *7th European Symposium of Porcine Health Management*.
8. Poulsen, H. D. (1995) “Zinc oxide for weanling piglets”, *Acta Agriculturae Scandinavica A: Animal Sciences*, 45, pp. 159–167.
9. Rhouma, M. *et al.* (2016) “Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives.”, *Frontiers in microbiology*, 7, p. 1789.



# VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DI DIVERSI TRATTAMENTI ORALI NEI CONFRONTI DELLE PRINCIPALI INFEZIONI INTESTINALI DEI SUINI ALL'INGRASSO

## EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF DIFFERENT ORAL TREATMENTS TOWARD THE MAIN INTESTINAL INFECTIONS OF FATTENING PIGS

GALLI M.C.<sup>1,2</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Libero professionista, Swivet Research snc*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova*

**Parole chiave:** infezioni intestinali, suini all'ingrasso

**Key words:** intestinal infection, fattening pigs

### RIASSUNTO

La crescente attenzione verso l'uso responsabile e la riduzione nella somministrazione dell'antibiotico in ambito zootecnico, determina la necessità di trovare alternative efficaci nel trattamento e prevenzione delle principali infezioni presenti in allevamento. Il presente studio ha voluto indagare quale potesse essere la miglior soluzione, sia dal punto di vista dell'efficacia che del consumo di antibiotici, nei confronti delle principali infezioni intestinali in suini accasati in un ingrasso presenza storica di clinica enterica. Per la prova sono stati coinvolti 1200 suini suddivisi in tre gruppi: il Gruppo A rappresentato dall'attuale metodo di controllo delle enteriti, ossia utilizzo di Lincomicina per os per 7 giorni all'insorgenza della clinica; il Gruppo B con somministrazione per tutta la fase di allevamento di un mangime complementare a base di prodotti ottenuti dalla trasformazione di vegetali e dalla miscela di sostanze aromatizzanti dall'accasamento in ingrasso; Gruppo C somministrazione di Ossitetraciclina per os alla manifestazione della malattia per 5 giorni, seguito da somministrazione del mangime complementare del gruppo B fino alla fine del ciclo di allevamento. I tre trattamenti non hanno mostrato differenze per quanto riguarda le performance produttive, la consistenza delle feci e la mortalità. Evidenti differenze sono state invece riscontrate sul consumo di antibiotici, dimostrando come il Gruppo B risulti la soluzione più adatta nella prevenzione e nel trattamento delle infezioni intestinali.

### ABSTRACT

The growing attention towards responsible use and the reduction in the administration of the antibiotic in the zootechnical field, determines the need to find effective alternatives in the treatment and prevention of the main infections present in the farm. The present study aimed to investigate which could be the best solution, both from the point of view of effectiveness and consumption of antibiotics, against the main intestinal infections of fattening pigs. 1200 pigs divided into three groups were involved in the test: Group A represented by the current enteritis control method, namely the use of Lincomycin orally for 7 days; Group B administration for the entire breeding phase of a complementary feed based on products obtained from the transformation of plants and the mixture of flavoring substances; Group C administration of Oxytetracycline orally to the onset of the manifestation of the disease up to the next 5 days, followed by administration of the complementary feed until the end of the cycle. The three treatments showed no differences in production performance, stool consistency and mortality. On the other hand, evident differences were found in the consumption of antibiotics,

demonstrating that Group B is the most suitable solution in the prevention and treatment of intestinal infections.

## INTRODUZIONE

Fin dalla loro scoperta, gli antibiotici sono risultati un mezzo fondamentale per il controllo delle malattie infettive, contribuendo a migliorare significativamente lo stato di salute degli animali e lo standard delle produzioni alimentari. Tale miglioramento rischia oggi di essere vanificato dal fenomeno dell'antibiotico-resistenza. La resistenza agli antimicrobici è un fenomeno naturale biologico di adattamento di alcuni microrganismi che acquisiscono la capacità di sopravvivere o di crescere in presenza di un agente antimicrobico. Negli ultimi anni, l'uso improprio degli antibiotici (l'utilizzazione inadeguata o per fini non terapeutici) ha accelerato la comparsa nonché la propagazione di microrganismi resistenti, provocando numerosi fallimenti terapeutici e costi più elevati per la sanità pubblica (COM/2011/0748). A livello nazionale la legislazione è già intervenuta rendendo sanzionabile l'uso improprio dei medicinali veterinari (art.108, comma 9, del Decreto Legislativo 193/2006) e stilando delle Linee Guida *“per l'uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell'antimicrobico-resistenza e proposte alternative”*, in conformità al Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (Action Plan) della Commissione Europea. Per uso prudente si intende *“l'uso di antimicrobici che massimizza l'effetto terapeutico e minimizza lo sviluppo dell'antimicrobico-resistenza”*. Attraverso questa strategia è possibile: preservare e mantenere l'efficacia terapeutica e la sicurezza degli antimicrobici; mantenere gli animali in salute; prevenire e/o ridurre la selezione di microrganismi resistenti; mantenere l'efficacia degli antimicrobici usati in medicina umana; proteggere la salute del consumatore assicurando la sicurezza degli alimenti di origine animale, sia in termini di residui che di trasferimento di microrganismi resistenti all'uomo. Per uso prudente si intende anche la messa in atto delle buone pratiche attuate per la prevenzione delle malattie, tra cui ad esempio, l'utilizzo di prodotti alternativi in grado di dare effetti positivi sul microbiota intestinale e di stimolare il sistema immunitario. Fra le sostanze più antiche e diffusi vi sono sicuramente gli estratti di piante e gli olii essenziali. Le piante possiedono infatti attività antimicrobiche e proprietà antivirali (Hammer et al., 1999; Smith-Palmer et al., 1998) e sono in grado di attivare il sistema immunitario (Chang et al., 1995; Barak et al., 2001). Il 78% dei farmaci presenti all'interno del prontuario farmaceutico sono infatti molecole estratte da piante officinali, ovvero vegetali che contengono, in uno o più dei loro organi (fiori, frutti, semi, foglie, gemme, radici, tuberi), sostanze utilizzate a scopo terapeutico o preventivo.

Nell'ottica dell'*uso prudente*, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare quale trattamento, tra quelli presi in considerazione, potesse essere più efficace nella risoluzione delle principali infezioni intestinali in suini all'ingrasso.

## MATERIALI E METODI

La ricerca è stata svolta presso un allevamento suinicolo sito in provincia di Mantova che si occupa dell'allevamento dei suini per il periodo di magronaggio e ingrasso. Per la prova sono stati coinvolti 1200 suini di circa 14 settimane di vita, appartenenti alla stessa banda, con provenienza, data di arrivo e genetica (Pic x Talent) comune a tutti i soggetti. Gli animali sono stati stabulati nella medesima struttura, in modo da garantire condizioni ambientali uguali ai diversi gruppi, questi ultimi composti da suini con un peso vivo medio iniziale omogeneo di 31 kg. Gli animali sono stati stabulati nello stesso capannone in 69 box adiacenti tra loro della capacità di 18 suini accasati a densità di legge (1 m<sup>2</sup>/capo), separati in 3 differenti settori ma identici sia nella struttura (pavimentazione a grigliato, fronte mangiatoia, numero e posizione

degli abbeveratoi) che nella gestione (personale addetto agli animali, orientamento nord-sud, razione alimentare a broda). I gruppi sperimentali, ognuno costituito da 23 box e 400 suini, sono stati così suddivisi:

-Gruppo A, rappresentato dall'attuale metodo di controllo delle enteriti, ossia utilizzo di Lincomicina per via os (Filolinc® polvere per soluzione orale, 400 mg/g, Huvepharma SpA) dalla manifestazione della malattia fino ai 7 giorni successivi, al dosaggio di 2,5 g/q.le di peso vivo;

-Gruppo B, somministrazione per tutta la fase di allevamento (già dall'accasamento) di un mangime complementare a base di prodotti ottenuti dalla trasformazione di vegetali dalle proprietà antidiarroiche, antiossidanti e antinfiammatorie, e dalla miscelazione di oli essenziali, dalle proprietà antimicrobiche (Enterosan® Green, Dox-al Italia S.p.A.) alla dose di 200g/100 kg di mangime. Alla comparsa di sintomi di enterite, somministrazione di Lincomicina 400mg/g al dosaggio di 2.5 g/q.le di peso vivo per 7 giorni;

-Gruppo C, somministrazione di Ossitettraciclina per via os (Trepox® polvere per soluzione orale, 500mg/g, Dox-al Italia S.p.A.) alla manifestazione della malattia fino ai 5 giorni successivi, al dosaggio di 7,5 g/q.le di peso vivo, seguito da somministrazione del mangime complementare utilizzato per il gruppo B fino alla fine del ciclo alla dose di 100g/100 kg di mangime.

Dei 400 suini coinvolti per ogni gruppo, a 40 sono stati applicate delle marche auricolari all'arrivo con numero identificativo univoco, in modo da poterli riconoscere e monitorare individualmente (120 in totale).

La prova ha avuto la durata dell'intero ciclo di ingrasso, ovvero poco più di 6 mesi (195 giorni di media). I suini della prova sono stati accasati il 6 Marzo 2019, la macellazione degli animali ha invece avuto luogo tra il 9 settembre 2019 ed il 25 settembre 2019.

**Analisi di laboratorio.** Il giorno dopo l'accasamento, a 15 degli animali orecchinati per gruppo (45 in totale) è stato effettuato un prelievo per la valutazione dello status sanitario degli animali: PRRS, circovirus, ed influenza. Durante lo svolgimento della prova, eventuali organi e visceri di animali deceduti sono stati portati all'IZS di Reggio Emilia per ulteriori analisi che escludessero un coinvolgimento di altre patologie nella clinica aziendale.

Inoltre all'insorgenza della sintomatologia clinica enterica, è stata effettuata una raccolta di un pool di feci per ciascun gruppo di trattamento, che è stato sottoposto ad un'analisi batteriologica, PCR e antibiogramma presso l'Istituto Zooprofilattico di Reggio Emilia (con particolare riferimento a *E. Coli*, *Clostridium* spp, *Lawsonia* I., *Brachyspira* H.). Una seconda raccolta delle feci e relativa analisi è stata ripetuta per ciascun gruppo al termine della prova.

**Accrescimento.** Ogni gruppo sperimentale (400 suini) è stato pesato all'arrivo in azienda e alla partenza verso il macello, ovvero poco più di 6 mesi dopo (195 giorni di permanenza di media). Il peso individuale dei suini con marca auricolare (40 per gruppo) è stato invece registrato all'accasamento, a metà ciclo e alla macellazione. La quantità di alimento cumulativa somministrata ad ogni box è stata registrata nell'intero ciclo di ingrasso per il calcolo dell'ingestione giornaliera media, l'incremento ponderale giornaliero medio e l'indice di conversione alimentare.

**Stato sanitario e diarrea score.** Tutti gli animali sono stati ispezionati 2 volte al giorno da personale specializzato, che ne ha monitorato lo stato sanitario ed eventuale presenza di diarrea, avvertendo tempestivamente il veterinario responsabile in caso di presenza di sintomatologia. Le principali osservazioni riguardavano: condizioni generali, cambiamento aspetto feci/diarrea, tosse, anomalie nel consumo di alimento, oltre che tempo di remissione



dei sintomi dopo le terapie. La consistenza delle feci all'interno dei box è stata annotata circa ogni 2 settimane, attraverso un sistema di punteggio in una scala da 0 a 2 box per box (0: assenza di diarrea; 1: tracce di diarrea; 2: diarrea evidente). Questa misurazione ha permesso di monitorare lo stato clinico intestinale degli animali in relazione al diverso gruppo di trattamento.

**Dati sanitari ed utilizzo dell'antibiotico.** Per ciascun gruppo sono stati registrati la mortalità e l'utilizzo di antibiotico (iniettabile e per os) che è stato necessario somministrare durante la prova a ciascun gruppo. Inoltre, è stata effettuata un'analisi dell'intervallo di insorgenza di diarrea rossa dall'accasamento degli animali alla manifestazione clinica, e dalla fine dell'eventuale trattamento antibiotico alla manifestazione clinica successiva durante l'intero ciclo di allevamento.

Per la quantificazione dell'utilizzo degli antibiotici, sono state utilizzate due unità di misura: 1) Mg/PCU, ovvero mg di principio attivo per unità di correzione della popolazione, così come utilizzato dall'ultimo report EU sul consumo dei farmaci 2) DDDAit, ovvero Defined Daily Doses Veterinary for Pigs come suggerito dall'EMA nel 2017 per il monitoraggio aziendale. Il calcolo è stato modificato secondo il peso medio del suino italiano (Pangallo et al., 2019).

**Analisi statistica.** Alla fine della raccolta dati è stata effettuata un'analisi statistica sui seguenti parametri: peso individuale dei 40 suini per gruppo nelle tre misurazioni, consumi alimentari e relativi incrementi e indice di conversione alimentare, diarrea score, mortalità, e consumi di antibiotico. I test utilizzati sono stati relativi al confronto tra medie (anova test) e al confronto tra frequenze (chi-quadro) a seconda del parametro.

## RISULTATI

**Analisi di laboratorio.** Le analisi del sangue effettuate il giorno dopo l'accasamento (07 marzo 2019), hanno evidenziato l'assenza in PCR del virus PRRS in tutti i gruppi, e la episodica presenza del PCV2 in un solo animale, appartenente al gruppo C. La sierologia della PRRS era positiva (con l'eccezione di soli due animali, uno del gruppo A ed uno del gruppo B), con valori di S/P da 0,6 a 2,0, con una moda di 1,6. Assente la positività sierologica al virus influenzale. Durante lo svolgimento della prova, per escludere il coinvolgimento di patologie a carattere respiratorio di origine virale o batterica, i polmoni di due animali deceduti sono stati analizzati, evidenziando l'assenza di patogeni al batteriologico così come l'assenza del virus PRRS e del virus influenzale.

Per quanto riguarda le analisi delle feci, le prime risalgono al 20 marzo 2019, data in cui si sono manifestati i primi segni clinici di diarrea nel gruppo A. Le analisi hanno evidenziato la presenza di *Brachyspira hyodysenteriae* e di *E.Coli* emolitico in tutti i gruppi, con sensibilità alle tetracicline ed ai lincosamidi. Alla fine della prova di campo (16 settembre 2019, ultima data disponibile ad avere la presenza contemporanea in azienda di animali appartenenti a tutti i gruppi sperimentali), tutti i tre gruppi sono stati testati, malgrado la completa assenza di sintomatologia. In tutti i 3 gruppi non è stata evidenziata la presenza di *Brachyspira* spp, né di batteri patogeni cresciuti su terreno culturale. Tuttavia nei gruppi B e C è stata riscontrata la presenza di *Lawsonia Intracellularis*.

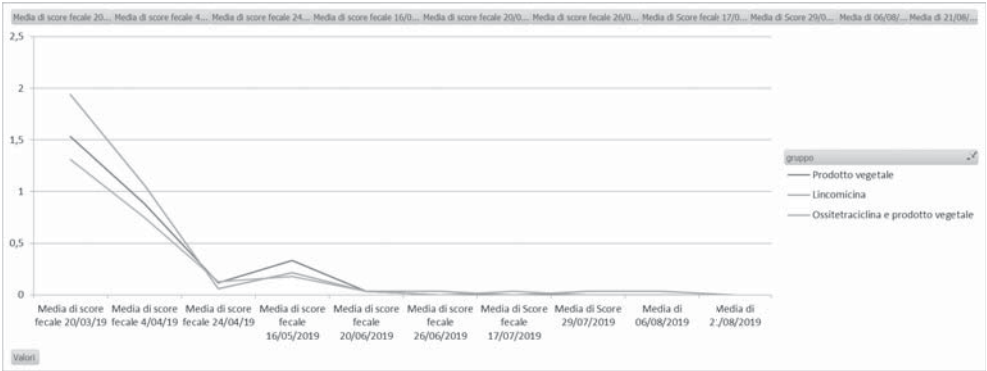
**Accrescimento.** La Tabella 1 riporta i dati relativi alle performance produttive. Non ci sono state differenze significative tra i gruppi sperimentali per nessuno dei parametri riportati.

**Tabella 1.** Effetto dei tre trattamenti sulle performance produttive  
**Table 1.** Effect of the three treatments on production performance

|                                  | A<br>Lincomicina | B<br>Prodotto<br>complementare | C<br>Ossitetraciclina e dopo<br>prodotto complementare |
|----------------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Peso medio al gg 0 (kg)          | 34,8             | 29,6                           | 29,3                                                   |
| Peso medio al gg 120 (kg)        | 130,2            | 125,2                          | 126,70                                                 |
| Peso medio al gg 195 (kg)        | 173,8            | 172,2                          | 171,3                                                  |
| Incrementi medi (kg)             |                  |                                |                                                        |
| 0-120 gg                         | 94,8             | 95,6                           | 96,3                                                   |
| 120-195 gg                       | 43,6             | 47,0                           | 44,6                                                   |
| 0-195 gg                         | 139,0            | 142,6                          | 142,0                                                  |
| Incrementi giornalieri medi (kg) |                  |                                |                                                        |
| 0-120 gg                         | 0,790            | 0,797                          | 0,802                                                  |
| 120-195 gg                       | 0,581            | 0,627                          | 0,595                                                  |
| 0-195 gg                         | 0,713            | 0,731                          | 0,728                                                  |
| Consumi/capo medi(kg)            | 495,0            | 493,6                          | 490,1                                                  |
| Resa                             | 28,0             | 28,9                           | 29,0                                                   |
| Indice di conversione alimentare | 3,56             | 3,46                           | 3,45                                                   |

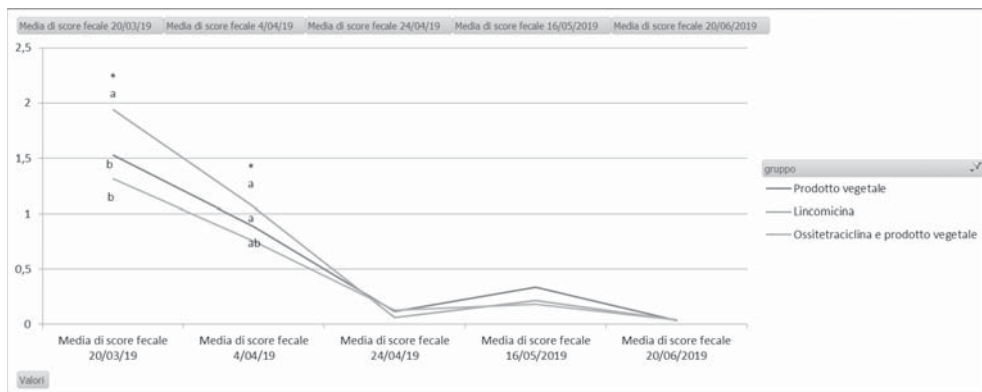
**Stato sanitario e diarrea score.** Nel corso della prova, gli animali hanno mostrato buono stato di salute generale, in assenza di episodi clinici riconducibili a patologie di origine differente da quella enterica, ad eccezione di una sola manifestazione respiratoria riscontrata a quattro settimane dall'accasamento. Gli animali sono stati trattati tutti con amoxicillina senza distinzione di gruppo di trattamento. L'amoxicillina è stata selezionata tra le molecole antibiotiche in quanto fortemente vocata alla risoluzione delle lesioni anatomopatologiche ritrovate a seguito di esame autoptico (tracce pleurite e pericardite) senza interferire con le molecole coinvolte nella prova in oggetto. Per quanto riguarda le manifestazioni cliniche di enterite, nella Figura 1 sono riportati gli score fecali medi riscontrati per ciascun gruppo durante ognuna delle rilevazioni cliniche a carattere bimensile (ogni 2 settimane).

**Figura 1.** Effetto dei tre trattamenti sulla media degli score fecali per ciascuna osservazione  
**Figure 1.** Effect of the three treatments on the average of the fecal scores for each observation



Si evidenzia come dal 20 giugno 2019 (ovvero giorno 106 di accasamento), non ci sia più alcuna manifestazione clinica di diarrea in nessuno dei tre gruppi. Si riporta dunque nella Figura 2 il dettaglio della prima parte del grafico, per una maggiore comprensione delle differenze tra gruppi del primo periodo.

Dal grafico emerge che la prima valutazione del diarrea score, il 20/3/19, ha evidenziato un punteggio maggiore, e quindi con maggior presenza di diarrea, nel gruppo lincomicina, ma che tale differenza si è poi annullata nella rilevazione effettuata 2 settimane dopo.



**Figura 2.** Effetto dei tre trattamenti sulla media degli score fecali nel primo periodo di osservazione

**Figure2.** Effect of the three treatments on the average of the fecal scores in the first observation period

\*P-value < 0,05;

a,b lettere diverse indicano differenza statisticamente significativa

**Dati sanitari ed utilizzo dell'antibiotico.** Nella Tabella 2 vengono riportati i dati relativi alla mortalità e all'utilizzo di antibiotico. Per quanto riguarda il primo parametro non vengono evidenziate differenze significative tra i gruppi sperimentali, mentre variano notevolmente per quanto riguarda l'utilizzo di antibiotico.

Il confronto dei consumi di antibiotici sia attraverso l'utilizzo dell'unità di misura Mg/PCU che DDDAit ha fatto emergere che rispetto agli altri due gruppi, l'utilizzo del mangime complementare fin dall'inizio dell'accasamento risulta essere premiante.

Inoltre, l'utilizzo già dall'accasamento del mangime complementare ha allungato molto il tempo di insorgenza delle prime manifestazioni cliniche di enterite, che è passato da 14 e 19 giorni (rispettivamente per il gruppo A ed il gruppo C) a 83 giorni. Inoltre, dopo il trattamento necessario ad 83 giorni per il gruppo B, non è stato necessario nessun altro intervento, a differenza dei ripetuti cicli di antibiotico per gli altri due gruppi (n. 3 per il gruppo A e n. 2 per il gruppo C).

**Tabella 2.** Effetto dei tre trattamenti sui dati sanitari e sull'utilizzo di antibiotico**Table 2.** Effect of the three treatments on health data and on the use of antibiotic

|                                                                  | A<br>Lincomicina | B<br>Prodotto<br>complementare | C<br>Ossitetraciclina e dopo<br>prodotto complementare |
|------------------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Mortalità                                                        | 3,0%             | 3,2%                           | 3,1%                                                   |
| Giorni tra l'accasamento e<br>l'insorgenza di diarrea            | 14               | 83                             | 19                                                     |
| Cicli di trattamento<br>antibiotico per os                       | 3                | 1                              | 2                                                      |
| Mg/PCU                                                           | 170,6            | 87,5                           | 192,8                                                  |
| Differenza % Mg/PCU<br>rispetto al gruppo controllo              | 0                | -49%                           | +13%                                                   |
| Differenza % Mg/PCU<br>rispetto alla media italiana <sup>1</sup> | -42%             | -70%                           | -35%                                                   |
| DDDAit                                                           | 19,63            | 9,62                           | 21,02                                                  |
| Differenza % DDDAit<br>rispetto al gruppo controllo              | 0                | -51%                           | +7%                                                    |
| Differenza % DDDAit<br>rispetto alla media italiana <sup>2</sup> | +8,4%            | -46%                           | +16,1%                                                 |

## DISCUSSIONE

Dall'analisi dei risultati relativi alle performance produttive e alla mortalità degli animali emerge come tutti e tre i gruppi siano stati efficaci nella risoluzione delle problematiche legate alle infezioni intestinali dei suini nell'ingrasso che ha ospitato la prova. Il confronto di questi dati non mostra infatti differenze significative tra i diversi trattamenti. Tuttavia, per quanto riguarda l'aumento dello score fecale nella prima parte del ciclo dovuto alla presenza di *Brachyspira hyodysenteriae* e di *E. Coli emolitico*, i gruppi trattati con il prodotto complementare già dall'accasamento hanno manifestato medie inferiori, sebbene la diminuzione della sintomatologia osservata successivamente confermi l'efficacia dei trattamenti in tutti i gruppi nella risoluzione di queste infezioni. È interessante sottolineare come nelle prime due rilevazioni degli score fecali, il gruppo A ed il gruppo C che avevano richiesto il precoce intervento antibiotico avevano dei livelli di diarrea pari o superiori a quelli del gruppo B che invece non era stato ancora sottoposto ad alcun trattamento antimicrobico. L'utilizzo dell'unità di misura Mg/PCU ha consentito un confronto dei consumi rispetto a quelli pubblicati a livello europeo. L'analisi delle DDDAit invece, consente un'analisi molto più puntuale dei consumi perché ogni principio attivo è moltiplicato con un proprio "coefficiente di peso". Questo secondo dato non è ancora però confrontabile con una media pubblicata a livello europeo (non ancora disponibile), ma può essere confrontato con i dati preliminari presenti per il territorio italiano (Pangallo et al., 2019).

Il gruppo A controllo (trattato con lincomicina) ha necessitato del maggior numero di cicli di trattamenti per os (n = 3), sebbene l'incremento maggiore delle DDDAit e dei Mg/PCU si sia osservato nel gruppo C. La lincomicina, molecola scelta per il gruppo controllo perché

<sup>1</sup> 294,8 mg/PCU; [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2016-trends-2010-2016-eighth-esvac\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2016-trends-2010-2016-eighth-esvac_en.pdf)

<sup>2</sup> Atti del congresso SIPAS 2019, Pangallo et al.

storicamente utilizzata nell'azienda che ha ospitato la prova per contrastare le problematiche enteriche, appartiene alla famiglia dei lincosamidi, e non rientra negli antibiotici criticamente importanti (CIA), ma viene utilizzata per trattare infezioni causate da batteri che possono acquisire geni di resistenza (WHO CIA list). In uno studio di De Luca et al. (2018) viene riportato come *B. Hyodysenteriae* possiede la capacità di acquisire elementi genetici mobili che conferiscono resistenza alla lincomicina. Si sono inoltre diffusi in molti paesi ceppi isolati di *B. Hyodysenteriae* con elevati valori di MIC per la lincomicina (Hampson et al., 2019). Inoltre, la lincomicina rientra negli antibiotici di categoria C (Caution, EMA 2020). L'introduzione nella razione alimentare del mangime complementare utilizzato in questa prova ha ridotto molto l'utilizzo dell'antibiotico per cause di origine enterica. Infatti, pur non azzerando il numero di trattamenti antibiotici necessari durante il ciclo, la sua introduzione ha ridotto ad un unico ciclo di trattamento antibiotico la necessità del gruppo B. Questa efficacia è risultata essere massima nel gruppo che ne ha assunto la dose massima già dall'accasamento, mentre la sua introduzione dopo le prime avvisaglie cliniche di diarrea ha avuto un esito parziale (gruppo C).

Gli effetti del mangime complementare sembrano essere dunque non tanto terapeutici quanto preventivi, nello specifico probabilmente per l'effetto astringente dato dal contenuto in tannini e le attività antimicrobiche, antiinfiammatorie e antiossidanti dati da tegumenti, corteccia e radici. Il pool di oli essenziali contenuto è riportato in bibliografia possedere azione di protezione dai patogeni in virtù delle proprietà antimicrobiche dei principi, tra i quali il Carvacrolo (*Origanum vulgare*) e la Cinnamaldeide (*Cinnamomum cassia*) efficaci contro gram negativi e positivi, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* (Sivropoulou et al., 1996; Dorman and Deans, 2000; Mahmoud, 1994; Ouattara et al.; 1997 Smith-Palmer et al., 1998; Kollanoor et al., 2008).

Il gruppo che invece aveva previsto la sostituzione della lincomicina con l'ossitettraciclina alla manifestazione dei sintomi e solo in seguito l'utilizzo del prodotto vegetale, non è risultato altrettanto efficace nella riduzione dell'utilizzo di antibiotico. È risultato infatti il gruppo che, per quanto riduca a due cicli di antibiotico al posto dei tre del gruppo controllo, determina il maggior quantitativo di DDDAit e Mg/PCU, pur essendosi dimostrato efficace nel contenimento dei sintomi di diarrea. È importante sottolineare però che le tetracicline rientrano nella categoria D, devono essere quindi preferite rispetto agli altri antibiotici e somministrati come prima linea di trattamento se l'antibiogramma ne mostra una sensibilità.

In conclusione, l'utilizzo del mangime complementare di origine vegetale utilizzato nella presente prova di campo sembra essere in grado di ridurre l'insorgenza di clinica enterica in animali accasati in allevamenti con presenza riscontrata di *B. Hyodysenteriae* e *E. Coli*, riducendo l'utilizzo di antibiotico. È importante però sottolineare anche che l'efficacia nella riduzione è maggiore quando lo si utilizza in prevenzione, in quanto è in grado di ritardare molto l'insorgenza dei primi sintomi clinici che necessitano dell'intervento antibiotico.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barak V., Halperin T., Kalickman, I. (2001) "The effect of Sambucol, a black elderberry-based, natural product, on the production of human cytokines: 1. inflammatory cytokines." Eur. Cytokine Netw. 12: 290–296.
2. Chang C. P., Chang J. Y., Wang F. Y., Change J. G. (1995) "The effect of Chinese medicinal herb Zingiberis rhizoma extract on cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells". J. Ethnopharmacol. 11: 13–19
3. COM/2011/0748 "Comunicazione della commissione al parlamento europeo e al consiglio: Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica"

4. Decreto 193/2006 “Attuazione della direttiva 2004/28/CE recante codice comunitario dei medicinali veterinari”
5. De Luca S., Nicholson P., Magistrali C.F., García-Martín A.B., Rychener L., Zeeh F., Frey J., Perreten V. (2018)
6. “Transposon-associated lincosamide resistance *lnc(C)* gene identified in *Brachyspira hyodysenteriae* ST83”
7. Vet. Microbiol., 214, pp. 51-55
8. EMA (2016) “Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016” Trends from 2010 to 2016
9. Eighth ESVAC report
10. EMA (2020) “Categorization on antibiotics for use in animals for prudent and responsible use”.
11. Ephraim P. L., Robert A. N. (2007) “*Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer” J. Ethnopharmacol., 109, pp. 177-206
12. Hammer K. A., Carson C. F., Riley, T. V. (1999) “Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts”. J. Appl. Microbiol. 86: 985–990
13. Hampson D.J., Lugsomya K., La T., Phillips N.D., Trott D.J., Abraham S. (2019) “Antimicrobial resistance in *Brachyspira*-An increasing problem for disease control.” Vet Microbiol 229:59–71.
14. Linee Guida “per l’uso prudente degli antimicrobici negli allevamenti zootecnici per la prevenzione dell’antimicrobico-resistenza e proposte alternative” Sezione per la Farmacosorveglianza sui Medicinali Veterinari, Ministero Della Salute
15. Mitchell L., Cheang S.K., Gerald M. (2015) “An in vitro study of anti-inflammatory activity of standardised *Andrographis paniculata* extracts and pure andrographolide” J. BMC Complem Altern M, 15: 18.
16. Pangallo G., Bassi P., Motta V., Salvarani C., Luppi A., Merialdi G., Scali F., Alborali G.L., Bosi P., Trevisi P.(2019) “Monitoraggio del consumo di antimicrobici negli allevamenti dell’Emilia Romagna nel periodo 2016-2017: dati preliminari” in “atti della società italiana di patologia ed allevamento dei suini 2019” 77-84
17. Panichayupakaranant P., Tewtrakul S., Yuenyongsawad S. (2010) “Antibacterial, anti-inflammatory and anti-allergic activities of standardized pomegranate extract” Food Chem., 123, pp. 400-403
18. Roy S., Rao K., Bhuvaneshwari C., (2010) “Phytochemical analysis of *Andrographis paniculata* extract and its antimicrobial activity” J. World J Microb and Biot, 26: 85-91
19. Smith-Palmer A., Stewart J., Fyfe, L. (1998) “Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens.” Lett. Appl. Microbiol. 26: 118–122.
20. Subhan N., Burrows G.E., Kerr P.G., Obied H.K. (2018) “Phytochemistry, Ethnomedicine, and Pharmacology of *Acacia*” Studies in Natural Products Chemistry, 57: 247-326
21. Suresh R.N., Amolkumar H. (2009) “Evaluation of immunomodulatory activity of an extract of andrographolides from *Andrographis paniculata*” J. Planta Med, 75(8): 785-791.
22. WHO CIA list 5th rev: <http://who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>





# ANALISI DELL'IMPATTO DELLA GENETICA DELLE SCROFE SU NUMERO E PESO DEI SUINETTI ALLA NASCITA IN UN ALLEVAMENTO ITALIANO

## ANALISYS OF SOW GENETIC ON PIGLETS NUMBER AND WEIGHT AT BIRTH IN AN ITALIAN SWINE FARM

GUADAGNINI G<sup>1</sup>., PONZONI D.<sup>1</sup>, OTTOLINI F.<sup>1</sup>, SALVINI F.<sup>1</sup>, GUADAGNINI M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *PigVet, Brescia*

<sup>2</sup> *Elanco Animal Health*

**Parola chiave:** Peso del suinetto alla nascita, razza della scrofa

**Key words:** Piglet weight at birth, sow genetic

### RIASSUNTO

Il peso alla nascita è un fattore fondamentale per la sopravvivenza del suinetto. In questo lavoro sono stati pesati 10254 suinetti provenienti da 657 scrofe. Il confronto dei dati produttivi raccolti in due database è stato statisticamente analizzato ed i suini sono stati divisi in “sottopeso” e “normopeso” in base al loro peso di nascita. Le scrofe sono state quindi divise in razze e dal confronto delle due razze prevalenti F e M, si è rilevato come la razza F sia decisamente più produttiva; in aggiunta la razza F è anche in grado di produrre più suini normopeso.

Il numero di suini normopeso, analizzato mensilmente, sembra migliorare dopo il mese di maggio 2019 cosa che coincide con un cambio alimentare che potrebbe quindi essere correlato. In generale le scrofe F sono la scelta migliore per produrre più suini e di maggior peso. I fattori alimentare e genetico potrebbero essere fattori chiave per produrre suinetti più pesanti.

### ABSTRACT

The piglet birth weight is a key factor on piglet survival. In this work 10524 piglets produced by 576 sows have been weighted. The comparison of productive data collected in two databases was analyzed with a statistic analysis. The piglets were dividend in light piglets and normal piglets considering their birth weight. The sows were analyzed considering sow genetics and only sow F and M were considered for this analysis. F genetic can produce more piglets and also more “normal” piglets. After a monthly analysis, we can find more “normal” piglets after May 2019, and in that month also the feed changed, and this new feed program could be correlated. At the end the F sows are the best choice to produce more piglets and more “normal” piglets. Feed and genetic factors could be the key factors to produce more heavy piglets.

### INTRODUZIONE

Il peso dei suinetti alla nascita è un fattore determinante sia per la sopravvivenza che per il conseguente peso allo svezzamento, oltre alle prestazioni nella fase di ingrasso (4,5). I suinetti con un peso inferiore a 800 gr possono presentare una mortalità superiore al 50% mentre la mortalità pre-svezzamento si riduce con il progressivo aumento del peso alla nascita (1). Altri autori (2,3) indicano 1,13 kg come soglia di peso alla nascita per una buona sopravvivenza nella fase pre-svezzamento, mentre i suini con peso inferiore possono raggiungere una mortalità pre-svezzamento del 58%.

Il peso alla nascita è direttamente correlato alla sopravvivenza al momento dello svezzamento (4), ed al raggiungimento del peso di mercato (4,5).

## MATERIALI E METODI

Per il presente lavoro sono stati presi in considerazione i dati provenienti da due diversi database appartenenti ad una azienda a ciclo chiuso multi-sito della Pianura Padana. Il database 1 è stato costruito a partire da un foglio Excel® nel quale sono stati raccolti i pesi individuali dei suinetti nati vivi ogni venerdì da un campione di scrofe scelte in modo aleatorio, nel quale è stata registrata anche l'identità della madre, prima di qualsiasi baliaggio.

Il database 2 proviene dal software gestionale dell'azienda, presso il quale vengono raccolti tutti gli eventi dell'azienda stessa. Sono stati presi in considerazione l'identità della scrofa, la data del parto, l'ordine di parto, la durata della gestazione, il numero di nati totali, il numero di nati vivi, il numero di nati morti ed il numero di mummificati.

Dopo aver analizzato i due database singolarmente, sono stati combinati e quindi analizzati attraverso il software di elaborazione statistica JMP13 (SAS) considerando un valore di  $p < 0,05$  per la significatività statistica.

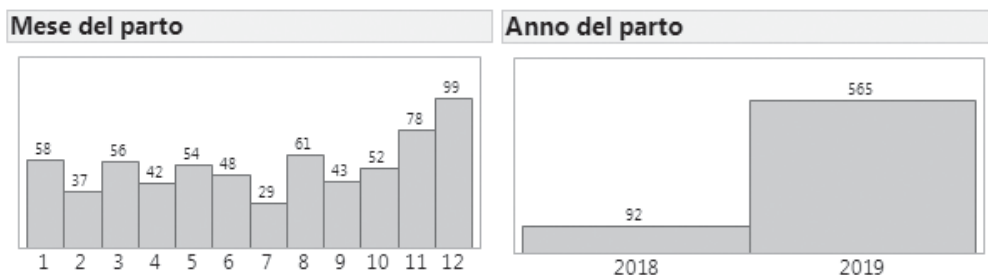
Nel nuovo database combinato sono state create alcune variabili originate da quelle presenti: mese ed anno del parto, gruppo di parto (primipare e pluripare), numero di suinetti sottopeso, numero di suinetti normopeso e % sottopeso sul totale dei nati vivi, peso medio dei suinetti per nidiata e peso totale dei suinetti della nidiata. E' stata quindi valutata la razza delle scrofe, criterio che utilizzeremo come discriminante per l'analisi della produzione aziendale e per il peso dei suinetti alla nascita.

La razza delle scrofe è stata stabilita in base al tipo genetico, motivo per il quale abbiamo evidenziato 4 razze aziendali: la D indica animali di razza Large White danese pura, la P indica la linea parentale PIC, la F la linea parentale di origine danese autoprodotta in azienda mentre la M indica la razza meticcias frutto dell'incrocio aziendale di differenti linee maschili e femminili senza un vero e proprio piano di selezione. L'analisi della razza è stata limitata ai due gruppi F ed M, visti gli esigui numeri delle altre due razze.

Il peso dei suinetti è stato valutato dividendolo in classi e considerando i suini con peso inferiore ad 800 gr (1) come "sottopeso aziendale" e i superiori a 800 gr come "normopeso aziendale", poiché, in base all'esperienza maturata in azienda, la sopravvivenza dei suinetti con peso superiore ad 800 gr risulta buona.

## RISULTATI

Nel database combinato sono presenti i dati del peso di 10254 suinetti prodotti da 657 scrofe con data parto compresa fra il 16/11/18 ed il 27/12/19. Di queste 100 (15%) sono primipare mentre le altre 557 (85%) sono pluripare.



**Figura 1.** Divisione dei parti in mesi ed anni

Se consideriamo le 657 nidiatae il numero dei suini nati totali varia da 3 a 30 con una media di 17,76 ed una mediana di 18, il numero dei nati totali varia da 2 a 29 con una media di 15,60 ed una mediana di 16. Per quanto riguarda i nati morti, il valore minimo è 0 mentre il massimo 14 con una media di 1,08 ed una mediana di 1, mentre per i mummificati il valore minimo è 0 ed il massimo è 10 con una media di 0,68 ed una mediana di 0.

Analizzando il peso totale delle nidiatae questo varia da 540 g a 35180 g, con un peso medio di 19701 g una mediana di 20310 g. Se analizziamo questo dato sui singoli suinetti rileviamo che il peso dei suinetti varia da un minimo di 540 grammi ad un massimo di 2337, con un peso medio di 1315 ed una mediana di 1277 grammi.

I suini della categoria “sottopeso aziendale” (<800 g) rappresentano l’11% e con un minimo di 0 ed un massimo di 12 per covata, una media di 1,74 ed una mediana di 1 per covata. Al contrario, se consideriamo i suini normopeso (>800g), sono l’89% dei suini pesati e vanno da un minimo di 1 ad un massimo di 25 con una media di 13,86.

La percentuale dei suini “sottopeso aziendale” in relazione ai nati vivi ha come minimo lo 0 e come massimo 69,2%, la mediana è 5,9%, il primo quartile è 0 ed il terzo 16,7%.

Se consideriamo il numero di suinetti “normopeso” in relazione al mese ed anno di nascita, possiamo notare come successivamente al mese di maggio 2019 il numero di questi soggetti tende ad aumentare significativamente (P=0,002).

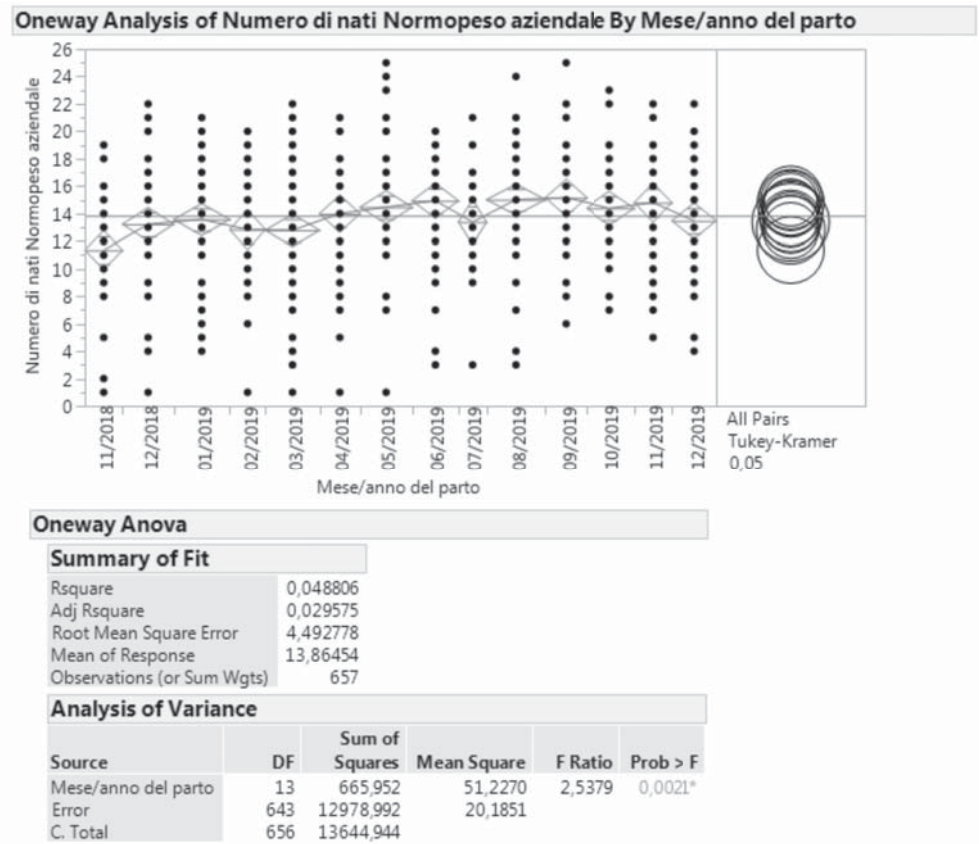
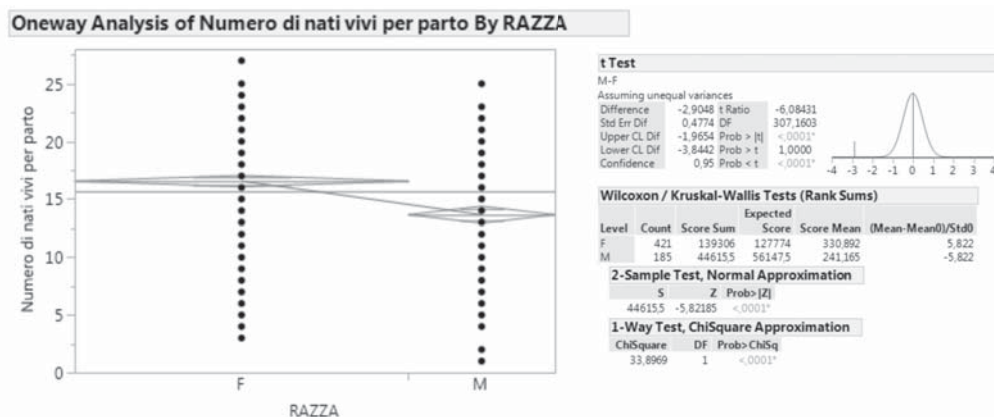


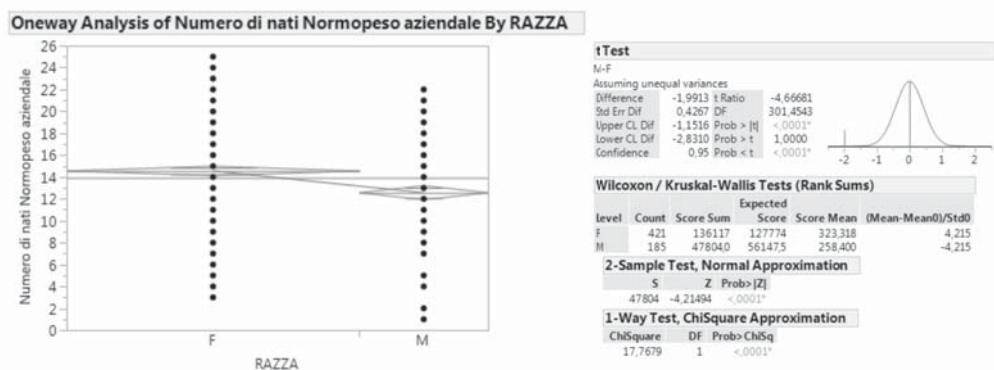
Figura 2. Andamento per mese e anno di parto dei normopeso

Analizzati i dati generali presenti nel database combinato, si è proceduto all'analisi dei valori dividendoli per razza:

la razza M presenta un numero di nati vivi per parto inferiore di 2,90 suinetti rispetto alla F ( $P<0,0001$ ), e presenta un numero di normopeso inferiore di 1,99 rispetto alle F ( $P<0,0001$ ). Tuttavia, analizzando, i suini "sottopeso" le scrofe di razza F presentano un numero maggiore rispetto alle M di 0,91 suinetti per nidiate ( $P<0,0001$ ).



**Figura 3.** Analisi dei nati vivi per razza



**Figura 4.** Analisi dei normopeso per razza

Dall'analisi delle scrofe per gruppo di parto (primipare e pluripare) evidenziamo una tendenza ad un maggior numero di normopeso per le pluripare ( $P=0,08$ ). Dall'analisi del peso totale delle nidiate diviso per razza troviamo una differenza significativa tra primipare e pluripare sia nella razza F che nella razza M: la differenza fra i due ordini di parto è rispettivamente di 1539g a favore delle pluripare per la razza F ( $p=0,007$ ) e di 4264g a favore delle pluripare per la razza M ( $p=0,03$ ).

Analizzando i fattori correlati al numero di suini "normopeso" per parto è fortemente correlato in maniera positiva al numero totale di suini nati totali ed al numero di suini nati vivi (rispettivamente  $R^2=0,50$  ed  $R^2=0,82$ ).

Al contrario, il numero dei nati morti è scarsamente correlato con il numero dei nati totali ( $R^2=0,03$ ).

**Bivariate Fit of Numero di nati Normopeso aziendale By Totale nati**

**Bivariate Fit of Numero di nati Normopeso aziendale By Numero di nati vivi per parto**

— Linear Fit

— Linear Fit

Nel secondo modello, tenendo conto del totale dei nati, del mese e anno del parto e del gruppo di parto le scrofe appartenenti alla razza F hanno partorito 1 suinetto normopeso in più rispetto alle scrofe M ( $P=0.009$ ).

La razza risulta senza dubbio un fattore determinante per i numeri di produzione: dal confronto tra le due razze risulta che la razza F è molto più produttiva rispetto alla M, poiché nonostante il gruppo F produca un numero maggiore di suinetti sottopeso (0,91) rispetto al gruppo M, genera anche un maggior numero di normopeso (1,99) rispetto alle scrofe di razza M. Oltre alla razza, anche il gruppo di parto risulta essere rilevante per la produzione di suini normopeso, con una tendenza alla produzione di un maggior numero di normopeso per le pluripare.

L'analisi dei normopeso su base mensile ed annuale evidenzia un aumento dei normopeso da maggio 2019 e coincide con un miglioramento della formulazione alimentare, che potrebbe, dunque, costituire un fattore determinante.

Il numero dei normopeso è positivamente correlato con il numero di suini nati totali e di nati vivi e scarsamente con i nati morti. La maggior produzione di suini riscontrata nelle scrofe F in questa azienda coincide sì con l'aumento di nati sottopeso (0,91), ma allo stesso tempo con un maggior numero di nati normopeso (1,99). Tale condizione sembra essere in contrapposizione alla diffusa opinione che maggiore è il numero di suini prodotti, minore è il peso e la qualità del suinetto.

Il peso totale delle nidiata risulta essere molto variabile: se consideriamo la distribuzione possiamo notare che tra il primo quartile (16725) ed il secondo quartile (20130) il peso aumenta del 20% circa e tra il 2° ed il 3°quartile (24000) possiamo rilevare un ulteriore aumento del 19% circa. Per raggiungere il valore del 90% dei valori delle nidiata si rileva un ulteriore aumento del peso del 10%.

Al fine di esplorare a fondo le implicazioni dei parametri raccolti potrebbe essere utile poter confrontare i dati relativi alle nidiata ed al peso dei singoli suinetti con il numero di svezzati, con il peso allo svezzamento e con la mortalità nel periodo pre-svezzamento. Tuttavia, in questa azienda viene praticato sia il pareggiamento che il baliaggio e, pertanto, risulta difficoltoso poter tracciare gli spostamenti dei singoli suinetti. Inoltre, i dati di produzione, tra cui la mortalità pre-svezzamento, il numero di suini svezzati ed il peso allo svezzamento sono dati raccolti in maniera aggregata rendendo impossibile paragonare due gruppi di suini differenti.

## **CONCLUSIONI**

All'interno della azienda in esame, le scrofe di genetica F risultano senza dubbio una scelta vincente per massimizzare sia la produzione di suinetti che di suinetti normopeso. La stagionalità non sembra avere particolare effetto, mentre il cambio alimentare inserito in maggio potrebbe essere positivamente correlato ad un aumento dei normopeso.

Vista la variabilità del peso totale della nidiata le necessità alimentari per la crescita della prole non possono essere facilmente uniformate. La produzione di una nidiata di 30 kg circa necessita di un apporto energetico ben diverso rispetto ad una nidiata di 16 kg circa; per questo motivo, il razionamento delle scrofe dovrebbe essere valutato attentamente, poiché potrebbe avere un impatto notevole sul peso totale della nidiata e sul numero di suinetti sottopeso. Il fattore genetico e quello alimentare potrebbero, pertanto, essere i più rilevanti per la produzione di un maggior numero di suinetti normopeso.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Brandt H. (1998) AGBU Pig Genetic Workshop 1998
2. Feldpausch J.A., Jourquin J., Bergstrom J., Bagen J.L., Bokenkroger C.D., Davis D.L., Gonzalez J.M., Nelssen J.L., Puls C.L., Trout W.E., Ritter M.J. (2019)
3. Jourquin J., Morales J., Bokenkroger C. (2016) "Pigs at risk: impact of birth weight on piglet survivability" P24<sup>th</sup> IPVS- 8<sup>th</sup> ESPHM, Dublin 7-10 June 2016, O-HHM1-003 pag 150
4. Jourquin J., Morales J., Bokenkroger C. (2016) "Pigs at risk: impact of birth weight increase on survivability and days to market, a simulation model" 24<sup>th</sup> IPVS- 8<sup>th</sup> ESPHM, Dublin 7-10 June 2016, PO-PC02-014 pag 288
5. Jourquin J., Morales J., Bokenkroger C. (2016) "Pigs at risk: impact of birth weight on weight gain until harvest" 24<sup>th</sup> IPVS- 8<sup>th</sup> ESPHM, Dublin 7-10 June 2016, PO-PT2-027 pag 292



# **EFFETTO DELLA SUPPLEMENTAZIONE DI L-ARGININA SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE E SUL PROFILO MICROBICO FECALE DELLA SCROFA IN GESTAZIONE**

## **CONTRIBUTE OF L-ARGININE SUPPLEMENTATION ON THE PRODUCTIVE PERFORMANCE AND MICROBIAL FECAL PROFILE OF GESTATING SOWS**

CORREA F., BERTOCCHI M., BOSI P., LUISE D., SPINELLI E., TREVISI P.

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) - Università di Bologna*

**Parole chiave:** L-Arginina, Scrofa, Gestazione, Microbiota

**Key words:** L-Arginine, Sow, Gestation, Microbiome

### **RIASSUNTO**

Studi recenti hanno mostrato come l'integrazione di L-Arginina (Arg), nella fase iniziale della gestazione in scrofe ad alta prolificità possa favorire la sopravvivenza embrionale, il numero di nati e il peso alla nascita dei suinetti. Inoltre, è stato osservato che l'Arg influenza il profilo microbico intestinale del suino, regolandone il metabolismo amminoacidico. L'obiettivo di questo studio è quello di verificare l'efficacia di un'integrazione di Arg sulle performance riproduttive ed il profilo microbico fecale della scrofa. Un totale di 205 scrofe è stato diviso in due gruppi sperimentali: i) controllo (CON) (102 scrofe); ii) gruppo trattato (ARG) (103 scrofe) la cui dieta è stata integrata con lo 0,25% in più di Arg per tutta la gestazione. I dati sulle performance della scrofa e della nidiata sono stati raccolti dal parto allo svezzamento. Inoltre, tre giorni prima del parto sono stati raccolti tamponi rettali per l'analisi del microbiota fecale. L'Arg ha aumentato il numero di suinetti nati ( $p = 0,043$ ), tendenzialmente aumentato il numero di nati vivi ( $p = 0,086$ ), ridotto la percentuale di IUGR ( $p = 0,090$ ) e di morti a d0-d3 ( $p = 0,088$ ). L'Arg non ha modificato la struttura microbica fecale (indici Alfa e Beta) ma ha aumentato l'abbondanza relativa della famiglia delle Bacteroidaceae e del genere *Bacteroides* ( $p = 0,0001$ ). I risultati confermano che l'Arg svolge un ruolo chiave nella nutrizione e nella fisiologia della scrofa in gestazione senza comprometterne l'eubiosi intestinale e suggeriscono un effetto positivo sulle performance produttive anche a una bassa dose di integrazione.

### **ABSTRACT**

Recent studies have shown that the integration of the amino acid L-Arginine (Arg), in highly prolific sows, in the initial phase of gestation has favoured embryonic survival, the number of piglets born and the birth weight. In addition, Arg also influence the microbiome profile of pigs, by regulating amino acid metabolism. The objective of this study was to test the effect of Arg supplementation on the sow's reproductive performance and on the faecal microbial profile. 205 sows were divided into two experimental groups: a control group (CON) (102 sows) and a group supplemented with 0.25% of Arg (ARG) for the whole pregnancy period. Data on the sow and litter performance were collected at farrowing, while before farrowing, rectal swabs were collected for the analysis of the microbial profile. Arg improved the number of total born piglets ( $p = 0.043$ ) and tended to improve the number of total born alive ( $p = 0.086$ ) and to reduce IUGR % ( $p = 0.090$ ) and dead piglets at d0-d3 ( $p = 0.088$ ). Arg did not modify the fecal microbial structure (alpha and beta indices) but increased the relative abundance of Bacteroidaceae family and Bacteroides genera ( $p$



= 0.0001). The results support the knowledge that Arg plays a key role in nutrition and physiology of pregnant sows without compromising gut eubiosis and suggest a positive effect on sow productive performance at a low supplementation dose.

## INTRODUZIONE

Nel suino, le moderne linee genetiche sono caratterizzate da elevata prolificità, carattere che è spesso associato ad una maggiore disomogeneità di peso della nidiata, con una percentuale superiore di soggetti sottopeso (< 1 kg) (Yuan et al. 2015). Il basso peso corporeo è correlato positivamente al tasso di mortalità e morbidità nel periodo nascita-svezzamento, dovuto prevalentemente ad una ridotta vitalità ed a una minore maturità fisiologica dei suinetti (Yuan et al. 2015).

Per quanto riguarda la gestazione, un'adeguata vasculogenesi e angiogenesi è necessaria per garantire l'irrorazione sanguinea della placenta, indispensabile per il corretto sviluppo fetale. In tale ottica, recenti lavori hanno dimostrato come l'integrazione di Arg nella fase iniziale di gestazione della scrofa, possa favorire la sopravvivenza embrionale, il numero di nati ed il peso alla nascita (Gonçalves et al., 2016), così come una integrazione nelle fasi finali è associato alla riduzione di nati morti e sottopeso (Nuntapaitoon et al., 2018). Inoltre, l'Arg è coinvolta in molteplici processi fisiologici quali il metabolismo lipidico in gestazione e la produzione di poliammine e ossido nitrico (effetto stimolante per l'angiogenesi placentare) in qualità di precursore di tali processi (Wu et al., 2017).

Inoltre, seppure vadano consolidandosi le evidenze del legame tra il microbiota fecale della madre ed il microbiota intestinale del neonato, non si rilevano studi sull'influenza dell'Arg sulla struttura del microbiota intestinale della scrofa. Ren et al., 2014 ha osservato come, in topi supplementati con Arg e immunostimolanti, sia aumentata l'abbondanza dei Bacteroidetes a discapito, invece, dell'abbondanza dei Firmicutes. Studi *in vitro*, hanno evidenziato come l'Arg possa influenzare l'utilizzazione e il metabolismo amminoacidico da parte dei batteri intestinali del suino, riducendo il tasso di catabolismo amminoacidico (Dai et al. 2012).

L'obiettivo di questo studio è di verificare l'efficacia dell'aggiunta di L-Arg nella dieta d gestazione della scrofa sulla numerosità, caratteristiche e sopravvivenza della nidiata, oltre che sull'equilibrio microbico intestinale delle scrofe..

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in una scrofaia commerciale situata in Emilia-Romagna.

La prova ha coinvolto un totale di 205 scrofe (Landrace x Large White) divise in due gruppi sperimentali, bilanciati per ordine di parto (3,26 + 2,2 d.s. and 3,37 + 2,2 d.s: i) Gruppo controllo (CON) ha ricevuto la dieta di gestazione normalmente usata nell'allevamento (**Tabella 1**); ii) Gruppo trattato (ARG), ha ricevuto la stessa dieta del gruppo CON in cui però il contenuto di Arg è stato aumentato di 0,25%, mediante l'uso di L-Arg di sintesi. Un aumento di 0,25% nel mangime rientra nell'intervallo più favorevole per le prestazioni di gestazione riscontrabile nella letteratura attuale (Palencia et al., 2018).

La dieta è stata differenziata tra i due gruppi sperimentali dall'ingresso in box di fecondazione ed è stata somministrata con sistema automatico, per tutto il periodo gestazionale.

**Tabella 1** - Ingredienti e composizione della dieta di gestazione delle scrofe del gruppo di controllo  
**Table 1** - Ingredients and composition of the sows' gestating control diet

| Ingredienti                      | Unità di misura | Valore       |
|----------------------------------|-----------------|--------------|
| Granoturco-mais                  | %               | 24,4         |
| Crusca frumento                  | %               | 20,0         |
| Orzo                             | %               | 14,0         |
| Frumento                         | %               | 8,0          |
| Trebbie essiccate di distilleria | %               | 8,0          |
| Sorgo                            | %               | 7,0          |
| Polpe barbabietola               | %               | 6,5          |
| Soia proteica                    | %               | 3,0          |
| Seme di lino                     | %               | 2,5          |
| Girasole 36% P.G.                | %               | 2,0          |
| Caco3 FINE                       | %               | 1,5          |
| Int. Vit-min.                    | %               | 1,0          |
| Grasso animale 8/10              | %               | 1,0          |
| Sale                             | %               | 0,4          |
| Fosf.bicalcico 18%               | %               | 0,3          |
| L-lisina                         | %               | 0,26         |
| Treonina                         | %               | 0,09         |
| Colina hcl 75%                   | %               | 0,05         |
|                                  |                 |              |
| Energia Metabolizabile calcolata | Kcal/kg         | 2950         |
| Composizione analizzata          |                 |              |
| Proteine grezze                  | %               | 14,7         |
| Estratto etereo                  | %               | 5,1          |
| Crude Fibre                      | %               | 5,4          |
| Ceneri                           | %               | 5,1          |
| Lisina                           | %               | 0,66         |
| Arginina                         | %               | 0,72         |
| Cistina                          | %               | 0,28         |
| Metionina                        | %               | 0,22         |
| Treonina                         | %               | 0,56         |
| Triptofano                       | %               | 0,123        |
| Valina                           | %               | 0,60         |
| Isoleucina                       | %               | 0,46         |
| Leucina                          | %               | 1,06         |
| Tirosina                         | %               | 0,44         |
| Fenilalanina                     | %               | 0,62         |
| Istidina                         | %               | 0,41         |
| Acido aspartico                  | %               | 0,92         |
| Acido glutammico                 | %               | 2,83         |
| Alanina                          | %               | 0,69         |
| Glycina                          | %               | 0,81         |
| Prolina                          | %               | 0,89         |
| Serina                           | %               | 0,62         |
| L_Arginina libera <sup>2</sup>   | %               | Non rilevato |
| L-Lisina libera                  | %               | 0.219        |

Al parto, su tutte le scrofe è stato rilevato il peso della placenta e la morfologia del cranio dei suinetti utilizzando il metodo di punteggio codificato nel progetto Europeo PROHEALTH (Matheson et al. 2018), per distinguere eventuali suinetti che avessero subito una restrizione intrauterina della crescita (IUGR = intrauterine growth retardation). Sono inoltre stati raccolti i dati relativi alla numerosità della nidiata, mortalità e cause associate ad essa.

Su un sottogruppo di animali, 62 scrofe del gruppo CON e 63 scrofe del gruppo ARG bilanciato per ordine di parto, è stato registrato il peso individuale dei suinetti alla nascita (P0) e allo svezzamento (P1). Da questo sottogruppo sono state scelte 36 scrofe/dieta da cui è stato raccolto un tampone rettale prima del parto

Dai tamponi rettali è stato estratto il DNA batterico totale tramite kit di estrazione (FastDNATMSpin Kit for Soil, MP Biomedicals Europe, LLC) per effettuare la caratterizzazione del microbiota. Il profilo microbico è stato caratterizzato sequenziando le regioni V3-V4 del gene 16S rRNA. Per l'analisi bioinformatica, è stata utilizzata la pipeline DADA2 (Callahan et al. 2016) la tassonomia è stata assegnata usando come riferimento il Silva Database (release 132) (Quast et al. 2013).

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando SAS versione 9.3 (SAS Inst. Inc., Cary, NC).

La procedura GLM è stata utilizzata per adattare le misure di peso e la durata della gestazione con un modello lineare che includeva come fattori la dieta, la classe di ordine di parto, la loro interazione e la banda, e per alcuni parametri delle covariate, quali il numero di nati vivi ed il numero di suini della nidiata post-adozione. I fattori banda e classe di parto sono stati rimossi dal modello quando non significativi.

Ai fini dell'analisi statistica le scrofe sono state raggruppate in classi di parto (1: primo parto; 2: secondo parto; 3: terzo parto; 4: quarto + quinto parto; 5: sesto in poi)

La procedura GENMOD è stata utilizzata con una distribuzione di Poisson e la funzione log per i dati di numerosità nelle nidiata e con una distribuzione binomiale e una funzione Logit per i tassi di mortalità e per altri rapporti percentuali sui valori di numerosità nelle nidiata. Il modello includeva come fattori la dieta, la classe di ordine di parto, la loro interazione e la banda, e per alcuni parametri delle covariate, quali la durata della gestazione ed il numero di suini della nidiata post-adozione.

Per il profilo microbico, le analisi statistiche su Alfa diversità, Beta diversità e composizione tassonomica sono state effettuate con software R v3.6, utilizzando i pacchetti PhyloSeq (McMurdie e Holmes 2013), Vegan (Dixon 2003) e lme4 (Bates et al., 2015).

Per l'Alfa diversità è stato utilizzato un modello ANOVA considerando come fattori l'ordine di parto diviso in categorie la banda e il trattamento (CON – ARG)

Per la Beta diversità è stato utilizzato un modello PERMANOVA (procedura “adonis”), considerando come fattori la categoria di parto, il trattamento e la banda e utilizzando come matrice di distanza Bray-Curtis.

Le differenze in composizione tassonomica tra i due gruppi (ARG e CON) sono state analizzate utilizzando il pacchetto DESeq2 basato su modelli lineari generalizzati binomiali negativi e che applica il metodo Benjamini-Hochberg per la correzione dei confronti multipli (Love, Huber, e Anders 2014).

## RISULTATI

In **Tabella 2** sono riportati i dati di peso della placenta e della durata della gestazione per i due gruppi sperimentali, aggiustate per l'ordine di parto, la banda ed il numero di nati vivi. La dieta non ha influenzato i due parametri.

**Tabella 2** – Peso della placenta e durata della gestazione nei due gruppi**Table 2** - Placenta weight and duration of gestation in the two groups.

|                       | Dieta |       |          |          | Ordine parto       | Banda    | Nati vivi    |          |
|-----------------------|-------|-------|----------|----------|--------------------|----------|--------------|----------|
|                       | CON   | ARG   | Err.S.M. | <i>p</i> | <i>p</i>           | <i>p</i> | Coefficiente | <i>p</i> |
| Peso placenta, g      | 2748  | 2763  | 96,3     | 0,904    | 0,000 <sup>1</sup> | <,0001   | 194          | <0,0001  |
| Durata gestazione, gg | 115,8 | 115,9 | 0,07     | 0,213    | 0,352              | 0,026    | -0,0775      | <0,0001  |

<sup>1</sup> Effetto dell'ordine di parto lineare e quadratico, ambedue  $P < 0,001$ .

In **Tabella 3** sono riportati i dati delle performance riproduttive della scrofa. La dieta ARG ha avuto un effetto statisticamente significativo sul numero di nati totali, maggiore nel gruppo ARG rispetto al CON ( $p=0,043$ ) così come è stata evidenziata una tendenza sul numero di nati vivi, maggiore nel gruppo ARG rispetto al CON ( $p=0,086$ ). Per la mortalità da 0 a 3 giorni di vita si è rilevata una tendenza positiva dell'effetto della dieta, con un minor numero di morti nel gruppo ARG rispetto al CON ( $p=0,088$ ).

Per gli stessi parametri riportati però in percentuale, non ci sono state differenze statisticamente significative. È stata rilevata solo una tendenza sulla percentuale di IUGR (calcolata sul numero di nati vivi), che sono diminuiti nel gruppo ARG rispetto al CON ( $p = 0,098$ ).

**Tabella 3** – Effetto della dieta arricchita in L-Arg sulle caratteristiche della nidiata dalla nascita allo svezzamento.**Table 3** – Effect of L-Arg supplementation on the litter characteristics from born to weaning.

|                                                               | Dieta |       |       |          | Ordine parto | Banda    |
|---------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|----------|--------------|----------|
|                                                               | CON   | ARG   | E.S.  | <i>p</i> | <i>p</i>     | <i>p</i> |
| Nati vivi, n                                                  | 12,58 | 13,40 | 0,03  | 0,125    | -            | -        |
| Nati morti, n                                                 | 0,76  | 0,96  | 0,112 | 0,117    | -            | -        |
| Nati totali, n                                                | 13,39 | 14,43 | 0,03  | 0,043    | 0,107        | -        |
| Mummificati, n                                                | 1,37  | 1,56  | 0,09  | 0,244    | <,0001       | -        |
| IUGR medi, n                                                  | 0,05  | 0,04  | 0,502 | 0,602    | 0,798        | 0,001    |
| IUGR lievi, n                                                 | 0,13  | 0,07  | 0,349 | 0,101    | 0,023        | 0,617    |
| IUGR totali, n                                                | 0,22  | 0,13  | 0,251 | 0,113    | 0,042        | 0,063    |
| Morti 0 – 3 giorni, n                                         | 1,07  | 0,84  | 0,11  | 0,088    | 0,001        | 0,107    |
| Morti 0-27 giorni, n                                          | 1,64  | 1,53  | 0,08  | 0,543    | 0,007        | 0,004    |
| Svezzati totali, n                                            | 10,97 | 11,45 | 0,031 | 0,316    | -            | -        |
| Nati morti/nati, %                                            | 5,73  | 6,75  | 0,115 | 0,260    | -            | -        |
| IUGR/nati vivi, %                                             | 1,68  | 0,99  | 0,253 | 0,098    | 0,070        | 0,045    |
| Mummificati/nati e mummificati, % <sup>1</sup>                | 9,35  | 9,82  | 0,090 | 0,656    | <,0001       | -        |
| Morti da 0 a 3 d/tot. allattati post-adozioni, % <sup>1</sup> | 8,32  | 6,84  | 0,112 | 0,172    | 0,010        |          |
| Morti tot./tot. allattati post-adozioni, % <sup>1</sup>       | 13,05 | 12,41 | 0,089 | 0,640    | 0,003        | 0,002    |

<sup>1</sup> I parametri sono stati significativamente influenzati dal numero di suinetti per nidiata post-adozione ( $p < 0,05$ ).

In **Tabella 4** sono riportati i dati relativi alle performance della nidiata dalla nascita fino allo svezzamento. La dieta non ha influenzato il peso della nidiata e l'IPG durante tutto il periodo di prova.

**Tabella 4** - Peso vivo della nidiata alla nascita e allo svezzamento ed incremento ponderale nei due gruppi.

**Table 4** - Live weight of the litter at birth and weaning and daily weight gain in the two groups

| <sup>1</sup> Parametro                             | Dieta |       |       |          | Ordine parto | Banda    | N suini post-adozione |
|----------------------------------------------------|-------|-------|-------|----------|--------------|----------|-----------------------|
|                                                    | CON   | ARG   | E. S. | <i>p</i> | <i>p</i>     | <i>p</i> | <i>p</i>              |
| Peso medio preadozione, kg                         | 1,39  | 1,36  | 0,023 | 0,620    | <0,0001      | 0,193    | -                     |
| Peso nidiata preadozione, kg                       | 17,81 | 18,19 | 0,476 | 0,574    | 0,007        | 0,916    | -                     |
| Peso nidiata post-adozione, kg                     | 17,18 | 17,59 | 0,360 | 0,420    | <0,0001      | 0,643    | -                     |
| Peso medio allo svezzamento, kg                    | 6,29  | 6,31  | 0,082 | 0,880    | 0,004        | 0,837    | 0,027                 |
| Peso nidiata allo svezzamento, kg                  | 68,90 | 69,08 | 1,536 | 0,933    | <0,0001      | 0,170    | <0,0001               |
| Incremento ponderale giornaliero della nidiata, kg | 2,23  | 2,27  | 0,064 | 0,681    | <0,0001      | 0,110    | 0,0007                |

<sup>1</sup>Relativo alle scrofe dei sottogruppi (CON, n = 63; ARG, n = 64).

Per quanto riguarda la caratterizzazione del profilo microbico, i valori di Alfa diversità (differenze all'interno del gruppo), Chao1, Shannon e Simpson sono riportati in **Tabella 5**. I dati non mostrano differenze significative tra i due trattamenti.

Per la Beta diversità la **Figura 2** mostra il grafico NMDS partendo da una matrice di distanza Bray-Curtis, dal grafico non si evince nessuna separazione netta tra i diversi trattamenti. Inoltre, il test Adonis non ha mostrato differenze significative per il fattore dieta **Tabella 6**.

**Tabella 5** - Alfa diversità per gli indici Chao1, Shannon, Simpson.

**Table 5** - Alpha diversity values for Chao1, Shannon, Simpson indexes.

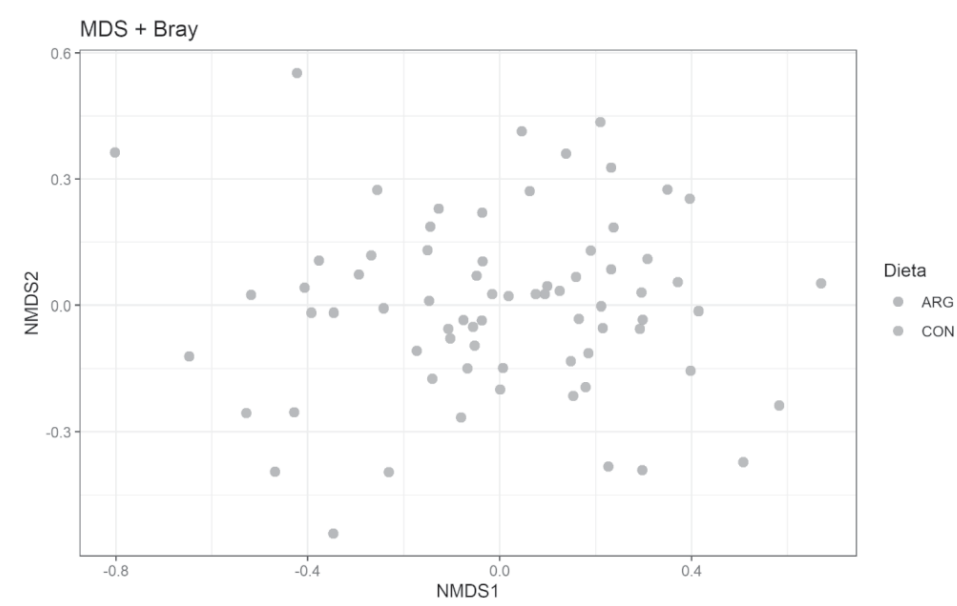
| Indice Alfa | CON    | ARG    | SE      | Df | <i>p</i> |
|-------------|--------|--------|---------|----|----------|
| Chao1       | 583    | 573    | 12      | 66 | 0,5609   |
| Shannon     | 5,36   | 5,32   | 0,0577  | 66 | 0,5833   |
| Simpson     | 0,9874 | 0,9857 | 0,00158 | 68 | 0,4597   |

**Tabella 6** - Risultati test Adonis

**Table 6** - Output of the Adonis test

|         | Gradi di libertà | Somma dei quadrati | Media dei quadrati | Test F  | R2      | <i>p</i> |
|---------|------------------|--------------------|--------------------|---------|---------|----------|
| Dieta   | 1                | 0,1139             | 0,11385            | 0,68628 | 0,00971 | 0,923    |
| Residui | 70               | 11,6128            | 0,1659             |         | 0,99029 |          |
| Totale  | 71               | 11,7267            |                    |         | 1       |          |

**Figura 2** - NMDS plot usando come matrice di distanza Bray-Curtis  
**Figure 2** - NMDS plot using Bray-Curtis as the distance matrix



Per quanto riguarda la composizione microbiologica, sono stati identificati un numero di ASV totale di 3011, distribuiti tra 21 diversi phyla, 30 classi, 85 famiglie, 212 generi, 71 specie diverse. A livello di genere quelli più comuni erano: *Rikenellaceae*, *Ruminocoaccaeae*, *Christensenellaceae* e *Treponema*. Tutte le differenze significative evidenziate da DEseq2 sono state riportate in **Tabella 7**.

**Tabella 7** - Risultati DEseq2 per i diversi livelli tassonomici.  
**Table 7** - DEseq2 output for the different taxonomic levels

| Taxa     | Name                 | log2FC <sup>1</sup> | lfcSE | p    | FDR  |
|----------|----------------------|---------------------|-------|------|------|
| ASV      | ASV_690              | 24,23               | 2,09  | 0,00 | 0,00 |
|          | ASV_215              | -23,53              | 2,41  | 0,00 | 0,00 |
|          | ASV_294              | -25,10              | 2,82  | 0,00 | 0,00 |
| Classe   | Negativicutes        | -0,67               | 0,17  | 0,00 | 0,00 |
| Ordine   | Selenomonadales      | -0,66               | 0,18  | 0,00 | 0,01 |
|          | Aeromonadales        | -13,95              | 0,38  | 0,00 | 0,01 |
| Famiglia | Bacteroidaceae       | 17,79               | 0,37  | 0,00 | 0,00 |
|          | Succinivibrionaceae  | -13,95              | 0,37  | 0,00 | 0,01 |
|          | Acidaminococcaceae   | -0,45               | 0,15  | 0,00 | 0,05 |
|          | Veillonellaceae      | -18,47              | 0,62  | 0,00 | 0,05 |
| Genere   | <i>Bacteroides</i>   | 17,98               | 0,37  | 0,00 | 0,00 |
|          | <i>Succinivibrio</i> | -13,77              | 0,37  | 0,00 | 0,02 |

<sup>1</sup>Log2FC: logarithmic fold change, indica il rapporto di espressione di un ASV tra due diverse condizioni (TRT e CON). Valori positivi indicano una ASV maggiormente espressa nel trattato, valori negativi maggiormente espressa nel controllo.

## DISCUSSIONE

Le linee genetiche moderne sono caratterizzate da elevata prolificità, spesso a discapito dell'omogeneità di peso della nidiata e da un aumento dell'incidenza di suinetti IUGR. Negli ultimi anni, diversi studi hanno evidenziato un possibile effetto favorevole dell'integrazione di Arg durante la gestazione nel migliorare le performance della scrofa e dei suinetti, aumentando il numero di nati vivi, il peso alla nascita e diminuendo la variazione di peso all'interno della nidiata (Gao et al. 2012; Gonçalves et al. 2016;). Nel nostro studio la supplementazione dello 0,25% di L-Arg in una dieta commerciale standard, che ha portato il livello di L-Arg totale allo 0,9%, per tutta la durata della gestazione, ha significativamente aumentato il numero di nati totali, tendenzialmente incrementato il numero di nati vivi e diminuito il tasso di mortalità nei primi 3 giorni dopo il parto, in accordo rispetto a quanto osservato da Gao et al. (2012); Gonçalves et al. (2016); Nuntapaitoon et al. (2018); Liu et al. (2012). Inoltre, si è osservata anche una tendenza sulla riduzione dell'incidenza di suinetti IUGR.

Contrariamente a quanto osservato da Nuntapaitoon et al. (2018) e Liu et al. (2012), nel nostro studio non è stato osservato alcun effetto dell'integrazione con L-Arg sul peso della nidiata alla nascita e allo svezzamento. Questo può essere spiegato dal fatto che negli studi citati è stata utilizzata una dose maggiore di L-Arg rispetto al presente studio. Ed inoltre nel nostro studio il gruppo CON ha ricevuto un livello base di Arg con la dieta standard dello 0.75%, che di per sé è già piuttosto elevato rispetto alle raccomandazioni proposte dall'NRC. Questo fattore potrebbe aver reso difficile evidenziare delle differenze tra i due gruppi per i fattori sopra elencati.

L'importanza del microbiota intestinale come fattore in grado di modulare lo sviluppo fisiologico e lo stato di salute dei suini sta diventando sempre più evidente. La struttura del microbiota intestinale è fortemente influenzata da numerosi fattori tra i quali la dieta (stimata del 57%) (Tomasello et al. 2014) it appears absolutely necessary to investigate the environmental factors favoring the onset of CRC and the promotion of colonic health. The gut microflora, or microbiota, has an extensive diversity both quantitatively and qualitatively. In utero, the intestine of the mammalian fetus is sterile. At birth, the intestinal microbiota is acquired by ingesting maternal anal or vaginal organisms, ultimately developing into a stable community, with marked variations in microbial composition between individuals. The development of IBD is often associated with qualitative and quantitative disorders of the intestinal microbial flora (dysbiosis). Pertanto, è ipotizzabile che l'integrazione della dieta con amino acidi liberi, in questo l'Arg, possa avere un effetto sulla composizione del microbiota intestinale, così come già osservato in topi supplementati con questo AA e immunostimolanti (Ren et al., 2014). Nel nostro studio per quanto riguarda il profilo microbico intestinale delle scrofe, non sono state osservate differenze significative per gli indici di diversità microbica, ciò indica che l'Arg non ha alterato l'eubiosi intestinale delle scrofe. Analizzando nel dettaglio la composizione tassinomica del microbiota fecale delle scrofe, è stato però evidenziato come l'integrazione con L-Arg ha aumentato il numero di batteri appartenente alla famiglia delle Bacteroidaceae ed al genere *Bacteroides*. Questo risultato trova parzialmente riscontro nei dati riportati da Wu et al. (2011) che hanno osservato, nell'uomo, l'influenza di una dieta con elevati livelli di proteine animali e amminoacidi sulla consistenza della famiglia delle Bacteroidaceae.

## CONCLUSIONI

In conclusione, l'integrazione dello 0,25% di Arg nella dieta della scrofa per l'intera durata della gestazione ha aumentato il numero di suinetti nati e non ha alterato il profilo microbico fecale delle scrofe. I risultati confermano che l'Arg è un AA essenziale per



sostenere le performance produttive della scrofa. Resta da chiarire se un'integrazione più elevata con questo AA possa avere un'influenza marcata sulle caratteristiche e la sopravvivenza della nidiata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bates, Douglas, Martin Mächler, Ben Bolker, e Steve Walker. 2015. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4". *J. Stat. Softw.* 67, 1–48.
2. Callahan, Benjamin J., Paul J. McMurdie, Michael J. Rosen, Andrew W. Han, Amy Jo A. Johnson, e Susan P. Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data". *Nat. Methods.* 13, 581–83.
3. Dai, Zhao-Lai, Xi-Long Li, Peng-Bin Xi, Jing Zhang, Guoyao Wu, e Wei-Yun Zhu. (2012). "Regulatory Role for L-Arginine in the Utilization of Amino Acids by Pig Small-Intestinal Bacteria". *Amino Acids* 43, 233–44.
4. Dixon, Philip. 2003. "VEGAN, a Package of R Functions for Community Ecology". *J Veg Sci* 14, 927–30.
5. Gao, Kaiguo, Zongyong Jiang, Yingcai Lin, Chuntian Zheng, Guilian Zhou, Fang Chen, Lin Yang, e Guoyao Wu. (2012). "Dietary L-Arginine Supplementation Enhances Placental Growth and Reproductive Performance in Sows". *Amino Acids* 42, 2207–14.
6. Gonçalves, M. a. D., K. M. Gourley, S. S. Dritz, M. D. Tokach, N. M. Bello, J. M. DeRouchey, J. C. Woodworth, e R. D. Goodband. (2016). "Effects of Amino Acids and Energy Intake during Late Gestation of High-Performing Gilts and Sows on Litter and Reproductive Performance under Commercial Conditions". *J Anim Sci* 94, 1993–2003.
7. Liu, X. D., X. Wu, Y. L. Yin, Y. Q. Liu, M. M. Geng, H. S. Yang, Francois Blachier, e G. Y. Wu. (2012). "Effects of Dietary L-Arginine or N-Carbamylglutamate Supplementation during Late Gestation of Sows on the MiR-15b/16, MiR-221/222, VEGFA and ENOS Expression in Umbilical Vein". *Amino Acids* 42, 2111–19.
8. Love, Michael I., Wolfgang Huber, e Simon Anders. (2014). "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2". *Genome Biol* 15, 550.
9. McMurdie, Paul J., e Susan Holmes. (2013) "Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data". *PLOS ONE* 8, e61217.
10. Matheson, Stephanie M., Grant A. Walling, e Sandra A. Edwards. 2018. "Genetic selection against intrauterine growth retardation in piglets: a problem at the piglet level with a solution at the sow level". *Genet Sel Evol* 50, 46
11. Nuntapaitoon, Morakot, Ramon Muns, Peter K. Theil, e Padet Tummaruk. (2018) "L-Arginine Supplementation in Sow Diet during Late Gestation Decrease Stillborn Piglet, Increase Piglet Birth Weight and Increase Immunoglobulin G Concentration in Colostrum". *Theriogenology* 121, 27–34.
12. Quast, Christian, Elmar Pruesse, Pelin Yilmaz, Jan Gerken, Timmy Schweer, Pablo Yarza, Jörg Peplies, e Frank Oliver Glöckner. (2013) "The SILVA Ribosomal RNA Gene Database Project: Improved Data Processing and Web-Based Tools". *Nucleic Acids Res* 41, 590–96.
13. Ren, Wenkai, Shuai Chen, Jie Yin, Jielin Duan, Tiejun Li, Gang Liu, Zemeng Feng, Bie Tan, Yulong Yin, e Guoyao Wu. (2014) "Dietary Arginine Supplementation of Mice Alters the Microbial Population and Activates Intestinal Innate Immunity". *J Nutr* 144, 988–95.

14. Tomasello, Giovanni, Pietro Tralongo, Provvidenza Damiani, Emanuele Sinagra, Benedetto Di Trapani, Marie Noelle Zeenny, Inaya Hajj Hussein, Abdo Jurjus, e Angelo Leone. (2014). "Dismicrobism in inflammatory bowel disease and colorectal cancer: Changes in response of colocytes". *World J Gastroentero* 20, 18121–30.
15. Wu, Gary D., Jun Chen, Christian Hoffmann, Kyle Bittinger, Ying-Yu Chen, Sue A. Keilbaugh, Meenakshi Bewtra, et al. (2011) "Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes". *Science* (New York, N.y.) 334, 105–8.
16. Wu, Guoyao, Fuller W. Bazer, Gregory A. Johnson, Cassandra Herring, Heewon Seo, Zhaolai Dai, Junjun Wang, Zhenlong Wu, e Xiaolong Wang. (2017) "Functional Amino Acids in the Development of the Pig Placenta". *Molec Reprod Dev* 84, 870–82.

# **CESTINO SPAZZATURA O RISORSA: ANALISI IN “VERTICALE” DELLE SCHEDE SCROFA A FINE CARRIERA**

## **TRASH OR RESOURCE COMPUTER TRASH: VERTICAL ANALYSIS OF SOW CARDS AT THE END OF THEIR CAREER**

PALADIN GB.,<sup>1</sup> NODARI M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *Medico Veterinario*

<sup>2</sup> *Allevatore*

**Parole chiavi:** scrofa, carriera, prestazione

**Keywords:** sow, career, performance

### **RIASSUNTO**

La carriera produttiva della scrofa è un parametro significativo perché misura e quantifica le intensità riproduttive e produttive esprimendole con tre valori: tempo di permanenza, numero di parti e numero di suinetti svezzati in carriera.

Sono stati analizzati 5 anni di rimonta anno per anno dal 2010 al 2014. Nel dicembre del 2019 sono state riformate le ultime scrofe rimontate nel 2014, quelle a carriera più lunga uscite dopo 6 anni di lavoro.

Con questa analisi non si vogliono “processare le prestazioni delle scrofe o le scelte di produzione” ma validare un percorso di analisi (verticale produttiva) l’unico capace di misurare e quantificare la carriera della singola scrofa e di tutte quelle partite nello stesso anno. Consente ancora di analizzare la ricaduta del costo materno sulla prole considerando anche i giorni improduttivi (le penalità). Rappresenta anche un valido e oggettivo supporto per interventi sanitari, nutrizionali e gestionali sulla mandria.

### **ABSTRACT**

The productive career of the sow is a significant parameter because it measures and quantifies the reproductive and productive intensities, expressing them with three values: residence time, number of parts and number of piglets weaned in the career. 5 years of comeback were analyzed year by year from 2010 to 2014. In December 2019 the last sows reassembled in 2014 were reformed, the longest career sows released after 6 years of work. With this analysis we do not want to “process the performance of the sows or the production choices” but to validate an analysis path (vertical production) the only one capable of measuring and quantifying the career of the single sow and of all those games in the same year. It still allows to analyze the impact of the maternal cost on the offspring also considering the unproductive days (the penalties). It also represents a valid and objective support for health, nutritional and management interventions on the herd.

### **INTRODUZIONE**

La mandria si compone di scrofe di diverso ordine di parto (demografia), la rimonta va a sostituire quelle che non sono più produttive. Coesistono pertanto scrofe “vecchie” entrate anche 5 anni prima (le migliori) con scrofe giovani entrate in partita nell’anno in corso.

Rovistando nel cestino fisico o del computer degli allevatori si possono trovare le schede di produzione delle scrofe riformate. Se organizzate e analizzate consentono di quantificare le prestazioni di tutta carriera non solo della singola scrofa ma di tutte quelle entrate in produzione in un determinato anno. Sono una garanzia di informazioni oggettive per scelte

gestionali e sanitarie a carico della mandria.

L'analisi sulla carriera è l'unica che realmente consente di processare e giudicare l'intensità e la longevità riproduttiva. E' una analisi ad approccio "verticale" che analizza l'intero periodo produttivo della scrofa e che trova nel numero di "suinetti svezzati carriera" la sintesi di riferimento e di confronto.

Consente ancora di monitorare e analizzare le cause che hanno decretato i tempi e i motivi della riforma dei "lotti" di rimonta, ma anche di trasferire sulla produzione il costo della scrofa. (ricaduta del costo del riproduttore sul singolo suinetto svezzato)

La carriera riproduttiva della scrofa inizia con la prima inseminazione artificiale e termina quando viene decretata la sua riforma e abbandona la mandria.

Se l'inizio è facilmente identificabile la fine è "molto frastagliata". Spesso la prima inseminazione non coincide con la "partenza" ma con una falsa partenza, come spesso la riforma non coincide con l'evento che chiude un ciclo: lo svezzamento. Se le false partenze allungano un normale ciclo le "riforme di necessità" sfuggono per loro natura alla conta dei giorni improduttivi perché il ciclo non si chiude.

Se i "cicli netti" sono abbastanza frequenti le "carriere nette" sono abbastanza rare.

Le penalità sono tante e riconoscono varie cause: le anestrie, il ritorno in estro, le vuote eco, gli aborti, le morte, le riformate per zoppia o per patologie gravi.

Queste si misurano in giorni persi o improduttivi che hanno una ricaduta negativa sulla ripartizione del costo della scrofa sui suinetti svezzati carriera.

## MATERIALE E METODI

Organizzare ed elaborare le prestazioni delle scrofe riformate è insolito. Il particolare programma di gestione in uso nell'allevamento in esame locato in Brescia consente, pescando dall'archivio storico, di scaricare tutte le informazioni necessarie e di poterle confrontare con i precedenti anni di rimonte. (verticale interna). Le informazioni sulle riformate per anno di rimonta, sono fatte con cadenza settimanale in concomitanza con l'inventario della mandria e rappresentano un "parametro cruscotto".

La rimonta è esterna accasata post pubere e convenzionale per PRRS per gli anni 2010, 2011 e 2012 quindi allo svezzamento e PRRS negative per gli anni 2013 e 2014. Il flusso interno prevede un periodo iniziale di segregazione sia per la rimonta post pubere che allo svezzamento. Sono state analizzate le schede produttive di tutte le scrofe rimontate negli anni 2010-11-12-13 e 2014 e cestinate negli anni successivi (ma talune anche nello stesso anno di rimonta). Nel corso del 2019 sono uscite di produzione le scrofe più longeve rimontate nel 2014.

Tre sono le categorie che definiscono le cause di riforma, la prima identificata come "fine carriera" si posiziona alla chiusura del ciclo (svezzamento) indipendentemente dalla demografia, la seconda "di necessità" quando il ciclo non si chiude e la terza per "morte".

Queste tre categorie sono state quantificate e analizzate ma non rientrano in questo lavoro.

I parametri riproduttivi oggetto delle elaborazioni sono:

- Numero di eventi parto carriera ovvero la intensità riproduttiva.
- I giorni di permanenza in mandria ovvero longevità riproduttiva.
- Il numero di svezzati carriera ovvero l'intensità produttiva.

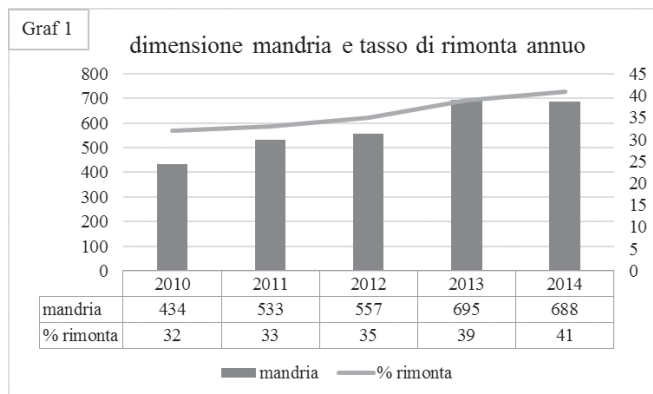
Come parametri derivati sono stati analizzati:

- Svezzati per parto.
- Giorni per ciclo.
- Giorni per svezzare 1 suinetto.
- Penalità: i giorni persi o improduttivi.
- Ricaduta del riproduttore su ogni suinetto svezzato

## RISULTATI

### Mandria e tasso di rimonta.

La dimensione della mandria e il tasso di rimonta dal 2010 anno di inizio dell'attività al 2014 evidenziano una progressiva e costante crescita. Graf. 1



### Tempo di permanenza (longevità riproduttiva)

Con l'eccezione della rimonta del 2011 (7 anni) le rimonte degli altri anni sono rimaste in mandria per 6 anni. Tab 1 e Graf. 2

tab 1

| anno rim | anno rif | n° scrofe | no parti | % anno | media parti | nv media | sv media | sv carriera |
|----------|----------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------|-------------|
| 2010     | 2010     | 2         | 2        | 2,9    | 1,5         | 7,3      | 7,7      | 11,5        |
|          | 2011     | 29        |          | 20,9   | 3,6         | 10,9     | 9,7      | 34,3        |
|          | 2012     | 45        |          | 32,4   | 6,0         | 11,7     | 9,8      | 58,6        |
|          | 2013     | 36        |          | 25,9   | 8,7         | 11,4     | 10,2     | 88,4        |
|          | 2014     | 18        |          | 12,9   | 11,1        | 11,8     | 9,9      | 110,2       |
|          | 2015     | 7         |          | 5,0    | 13,29       | 11,5     | 10,6     | 140,3       |
| sommano  | 6        | 139       | 2        |        | 7,1         | 11,5     | 10,0     | 70,5        |

| anno rim | anno rif | n° scrofe | no parti | % anno | media parti | nv media | sv media | sv carriera |
|----------|----------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------|-------------|
| 2011     | 2011     | 8         | 5        | 7,4    | 1,3         | 10,8     | 5,9      | 7,4         |
|          | 2012     | 26        |          | 14,8   | 2,3         | 10,5     | 10,2     | 23,5        |
|          | 2013     | 44        |          | 25,0   | 4,2         | 11,5     | 10,2     | 43,1        |
|          | 2014     | 54        |          | 30,7   | 6,8         | 11,5     | 10,3     | 69,9        |
|          | 2015     | 25        |          | 14,2   | 9,5         | 11,3     | 10,2     | 96,7        |
|          | 2016     | 13        |          | 7,4    | 10,8        | 11,5     | 10,0     | 108,9       |
|          | 2017     | 1         |          | 0,6    | 14          | 9,5      | 9,79     | 137,0       |
| sommano  | 7        | 176       | 5        |        | 5,8         | 11,3     | 10,2     | 58,6        |

| anno rim | anno rif | n° scrofe | no parti | % anno | media parti | nv media | sv media | sv carriera |
|----------|----------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------|-------------|
| 2012     | 2012     | 7         | 11       | 9,2    | 1,1         | 11,4     | 11,3     | 12,9        |
|          | 2013     | 36        |          | 18,5   | 2,0         | 11,1     | 9,3      | 18,9        |
|          | 2014     | 57        |          | 29,2   | 4,1         | 11,0     | 10,6     | 43,2        |
|          | 2015     | 35        |          | 17,9   | 6,5         | 11,1     | 10,2     | 65,8        |
|          | 2016     | 43        |          | 22,1   | 9,2         | 11,2     | 9,8      | 90,2        |
|          | 2017     | 6         |          | 3,1    | 11,2        | 11,9     | 9,5      | 106,0       |
| sommano  | 6        | 195       | 11       |        | 5,1         | 11,2     | 10,1     | 51,5        |

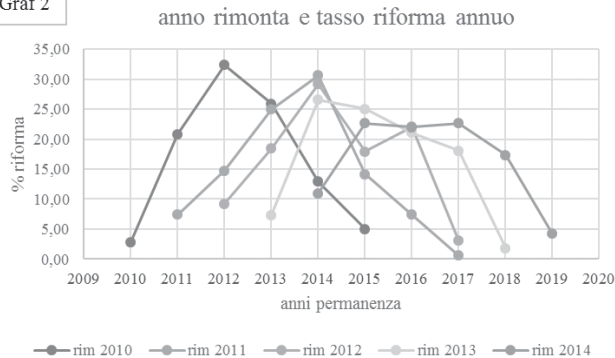
Un approfondimento per gli anni 2013 e 2014 (Tab 2 e Graf 2) evidenzia come il numero i giorni di permanenza sia rispettivamente di 807 e 830 giorni. La durata del ciclo è di 163,8 e 160,4 giorni con una penalità (giorni improduttivi) rispettivamente di 21 e 18 gg per ciclo.

tab 2

| anno rim | anno rif | n° scrofe | no parti | % anno | media parti | nv media | sv media | sv carriera | gg perm | gg suino | gg ciclo | penalità ciclo |
|----------|----------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------|-------------|---------|----------|----------|----------------|
| 2013     | 2013     | 13        | 7        | 7,4    | 1,0         | 10,5     | 10,1     | 10,1        | 164     | 16,3     | 164,2    | 22,2           |
|          | 2014     | 72        | 7        | 26,6   | 2,1         | 11,3     | 10,2     | 21,4        | 387     | 18,1     | 184,3    | 42,3           |
|          | 2015     | 68        |          | 25,1   | 4,1         | 11,4     | 10,3     | 42,8        | 711     | 16,6     | 171,4    | 29,4           |
|          | 2016     | 57        |          | 21,0   | 6,5         | 11,3     | 10,2     | 65,8        | 1.080   | 16,4     | 166,9    | 24,9           |
|          | 2017     | 49        |          | 18,1   | 9,4         | 11,1     | 10,5     | 98,1        | 1.403   | 14,3     | 149,4    | 7,4            |
|          | 2018     | 5         |          | 1,8    | 12          | 9,8      | 10,3     | 124,0       | 1.786   | 14,4     | 148,9    | 6,9            |
| sommano  | 6        | 271       | 13       |        | 4,9         | 11,19    | 10,3     | 50,8        | 807     | 15,9     | 163,8    | 21,8           |

| anno rim | anno rif | n° scrofe | no parti | % anno | media parti | nv media | sv media | sv carriera | gg perm | gg suino | gg ciclo | penalità ciclo |
|----------|----------|-----------|----------|--------|-------------|----------|----------|-------------|---------|----------|----------|----------------|
| 2014     | 2014     | 18        | 13       | 11,0   | 1,1         | 8,1      | 7,6      | 8,4         | 170     | 20,2     | 153,4    | 11,4           |
|          | 2015     | 57        | 7        | 22,7   | 1,9         | 10,5     | 9,8      | 19,1        | 351     | 18,3     | 180,3    | 38,3           |
|          | 2016     | 62        |          | 22,0   | 4,2         | 11,2     | 10,1     | 42,0        | 695     | 16,5     | 167,0    | 25,0           |
|          | 2017     | 64        |          | 22,7   | 7,1         | 11,0     | 10,6     | 74,5        | 1.099   | 14,8     | 155,7    | 13,7           |
|          | 2018     | 49        |          | 17,4   | 9,6         | 11,3     | 10,6     | 102,1       | 1.451   | 14,2     | 150,6    | 8,6            |
|          | 2019     | 12        |          | 4,3    | 12,2        | 11,88    | 10,41    | 126,7       | 1.809   | 14,3     | 148,7    | 6,7            |
| sommano  | 6        | 282       | 20       |        | 5,2         | 11,16    | 10,4     | 53,7        | 830     | 15,5     | 160,4    | 18,4           |

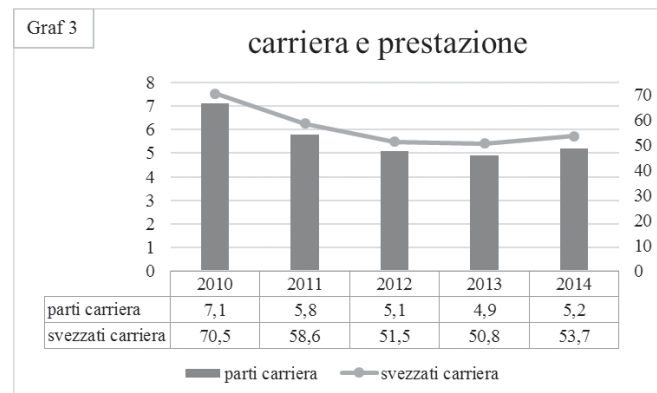
Graf 2



### Parti carriera (intensità riproduttiva)

Sono compresi nell'intervallo tra il valore massimo di 7,1 parti carriera per la rimonta 2011 e quello minimo di 4,9 parti per la rimonta 2013. La storia sanitaria della mandria giustifica queste prestazioni. Gra 3

Graf 3



### Svezziati carriera scrofa

Sono compresi tra il valore massimo di 70,5 (rimonta 2011) e quello minore di 50,8 per la rimonta del 2013. Gra 3

### **Derivati**

#### Svezziati per parto

Sono compresi tra i valori minore di 10 e maggiore di 10,4. Tab 1 e 2

#### Nati vivi per parto

L'intervallo tra il valore maggiore e minore 0,36 con un valore medio di 11,25. Tab 1 e 2

#### Giorni per ciclo

Il ciclo riproduttivo si chiude in 164 giorni per le rimontate nel 2013 e in 160 giorni per quelle rimontate nel 2014. Consentendo rispettivamente 2,2 e 2,3 cicli anno, ovvero 22,2 e 23,6 svezziati anno. Tab 2

#### Giorno per svezzare 1 suinetto

Sono necessari 15,9 giorno per svezzare un suinetto per la rimonta 2013 mentre sono 15,5 per quella del 2014. Tab 2

#### Ricaduta del riproduttore sul suinetto svezziato

La ricaduta penalizza il divisore più piccolo (numero di svezziati carriera). Il peso del genitore è minore per le prestazioni della rimonta del 2011 e maggiore per quella del 2013.

### **CONCLUSIONI**

Si riconosce la validità dell'analisi delle schede produttive delle scrofe riformate (verticale) nel corso degli anni. Queste sono le uniche che testimoniano la durata della carriera, l'intensità riproduttiva e quella produttiva.

Sono in grado di evidenziare e quantificare i giorni improduttivi e la loro ricaduta sulla ripartizione del costo del riproduttore.

Il confronto con le prestazioni del momento (analisi orizzontale) è utile se associato a questa verticale.

L'obiettivo di questo lavoro è di validare l'importanza di questa analisi e non di giudizio su una prestazione.

I risultati e le informazioni ottenute consentono di oggettivare scelte gestionali, alimentari o sanitarie.

Lo staff tecnico produttivo dell'allevamento interroga continuamente l'andamento delle prestazioni carriera confrontandole, in verticale, con quelle precedenti. Le ritiene uniche e strategiche per l'economia di produzione della mandria.





# INDAGINE IN SUINI DOMESTICI E SELVATICI DELLA PROVINCIA DI BRESCIA PER EVIDENZIARE *ESCHERICHIA* *COLI* PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO ED AMPC

## INVESTIGATION OF EXTENDED-SPECTRUM AND AMPC B -LACTAMASES-PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* IN DOMESTIC AND WILD SUIDAE IN THE PROVINCE OF BRESCIA

GUARNERI F.<sup>1</sup>, FORMENTI N.<sup>1</sup>, CALÒ S.<sup>1</sup>, PARISIO G.<sup>1</sup>, BIRBES L.<sup>1</sup>, PITOZZI A.<sup>1</sup>,  
SCALI F.<sup>1</sup>, TONNI M.<sup>1</sup>, GUADAGNO F.<sup>1</sup>, GIOVANNINI S.<sup>1</sup>, SALOGNI C.<sup>1</sup>,  
IANIERI A.<sup>2</sup>, BELLINI S.<sup>1</sup>, PASQUALI P.<sup>3</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna;

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco, Università di Parma;

<sup>3</sup>Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità

**Parole Chiave:** suidi, gene CTX-M, classi di età

**Key Words:** suids, CTX-M gene, age classes

### RIASSUNTO

L'antibiotico resistenza (AMR) rappresenta un complesso problema globale. *Escherichia coli*  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) e AmpC (AmpC) sono di principale interesse per le ampie ripercussioni sanitarie. Tra le specie ospite, quelle selvatiche rivestono un ruolo importante e, in particolare, il cinghiale per il costante aumento delle sua densità di popolazione e i dati ancora limitati sull'AMR. Pertanto, sono stati investigati la diffusione di *E. coli* produttori ESBL/AmpC e i fattori epidemiologici ad essi associati in 1504 cinghiali provenienti da quattro aree della provincia di Brescia e, in maniera preliminare, è stato condotto un confronto con i dati emersi dalla sorveglianza dei geni di resistenza ESBL/AmpC in *E. coli* isolati in 80 maiali della stessa provincia.

Nei cinghiali è emersa una prevalenza del 15,96% di *E. coli* ESBL/AmpC, supportata dal riscontro dei geni CTX-M (12,3%), TEM (6,98%), CMY (0,86%) e SHV (0,47%), la quale è risultata essere maggiore negli animali giovani rispetto ad adulti e sub-adulti. Nei suini, sono emerse prevalenze di CTX-M (85%), SHV (6,25%), CMY (10%) e TEM (55%) significativamente più alte di quelle dei cinghiali suggerendo un uso eccessivo di antibiotici negli allevamenti suini. Ulteriori analisi sarebbero auspicabili per investigare *E. coli* ESBL/AmpC in allevamenti e aree di smaltimento in sovrapposizione spaziale con le popolazioni di cinghiale per definire se la loro presenza possa influenzarne la diffusione nella specie selvatica.

### ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) represents a complex global issue. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpCs (ESBL/AmpC) *Escherichia coli* deserves attention for their broad repercussions, also on public health. Moreover, wild host species are of interest and particularly wild boar. Indeed, the constant increasing of its population densities and the still limited data about AMR lead to health risks where spatial overlap with domestic animals and

humans occurs. Therefore, prevalence of ESBL/AmpC-producing *E. coli* and the associated epidemiological factors were investigated in 1504 wild boars from four areas of the province of Brescia and, as a preliminary step, a comparison was made with data from the surveillance of ESBL/AmpC resistance genes in *E. coli* isolated from 80 pigs from the same province. A prevalence of 15.96% of ESBL/AmpC-producing *E. coli*, supported by CTX-M (12.3%), TEM (6.98%), CMY (0.86%) and SHV (0.47%) genes detection, emerged in wild boar. Young animals were more infected by ESBL/AmpC strains and CTX-M than older ones. In swine, prevalences of CTX-M (85%), SHV (6.25%), CMY (10%) and TEM (55%) were recorded and resulted significantly higher than those of wild boars leading to an over-use of antibiotics in pigs farms. Further analyses would be desirable to investigate *E. coli* ESBL/AmpC on both farms and in disposal areas present in spatial overlap with wild boar to investigate whether the presence of these strains may influence their spread in this wild species.

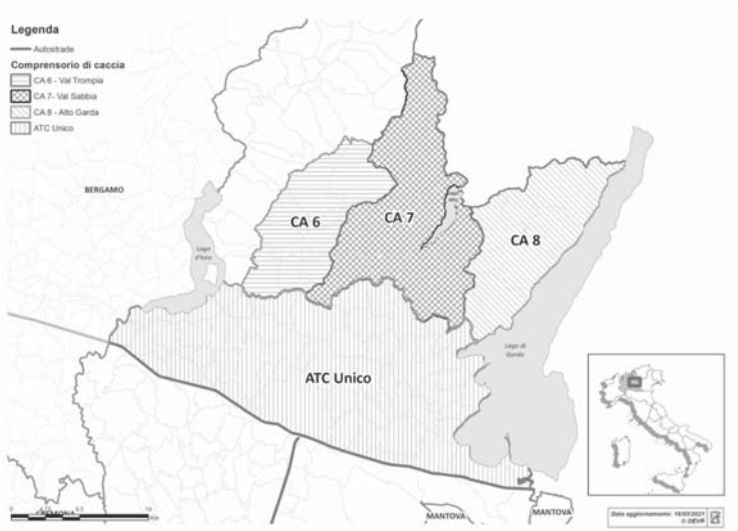
## INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza (AMR) rappresenta un problema di rilevanza mondiale (Wasyl et al., 2018). Gli animali possono avere un ruolo da reservoir di microrganismi non necessariamente patogeni ma resistenti agli antimicrobici che, attraverso il contatto diretto o la catena alimentare, possono contribuire alla diffusione e/o al mantenimento dell'AMR in ambito umano (Dahms et al., 2015). Numerosi sono i batteri che concorrono a rendere complesso il problema della resistenza agli antimicrobici e fra questi, uno dei principali, è *Escherichia coli*, microrganismo ubiquitario che può comportarsi sia da commensale che da patogeno, responsabile di infezioni intestinali ed extra-intestinali in numerosissime specie animali, uomo compreso (Wu et al., 2013). Tra i ceppi di *E. coli* su cui va posta particolare attenzione, vi sono quelli produttori di  $\beta$ -lattamasi, a spettro esteso (ESBL) e di altre  $\beta$ -lattamasi quali le AmpC codificate da geni a localizzazione plasmidica (von Salviati et al., 2015). Essi conferiscono resistenza alla maggior parte degli antibiotici beta-lattamici, comprese le cefalosporine di terza e quarta generazione, limitando in maniera preoccupante le opzioni di trattamento in caso di infezione. L'aumento della prevalenza di *E. coli* produttori di ESBL/AmpC rende sempre più difficoltoso il controllo delle patologie nel suino (*Sus scrofa domestica*) e rappresenta un grave problema di sanità pubblica (Agersø e Aarestrup, 2013). Inoltre, la presenza di *E. coli* ESBL/AmpC è stata segnalata anche negli animali da compagnia, in quelli da zoo e nella fauna selvatica (Vale et al., 2020; Holtmann et al., 2021). Nello specifico, le specie a vita libera non sono generalmente trattate con antimicrobici e possono acquisire batteri AMR o residui antimicrobici attraverso cibo e acqua in ambienti contaminati da animali domestici o dall'uomo (Heuer et al., 2011). Infatti, negli animali selvatici che frequentano ambienti antropizzati o che sono in stretto contatto con persone o aree agricole è stato dimostrato un livello più elevato di AMR (Tinoco Torres et al., 2020). Fra queste specie, il cinghiale (*Sus scrofa*) risulta essere un indicatore importante per la valutazione della diffusione ambientale di geni di resistenza (Dahms et al., 2015), sebbene i dati disponibili sull'AMR, soprattutto rispetto ai fattori epidemiologici che possono influenzarne la diffusione, siano al momento limitati. Tali aspetti risultano di particolare interesse in questa specie in quanto "invasiva", filogeneticamente molto vicina al maiale, con densità di popolazione in netto aumento e possibilità di contatto con i suini domestici e con aree maggiormente antropizzate. Pertanto, sono stati investigati la diffusione di *E. coli* produttori ESBL/AmpC e i fattori epidemiologici associati alla loro presenza e alla trasmissione in cinghiali di diverse aree della provincia di Brescia e, in maniera preliminare, è stato condotto un confronto con i dati emersi dalla sorveglianza dei geni di resistenza ESBL/AmpC in *E. coli* isolati dai maiali nella stessa provincia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Nell’ambito dell’attività della sezione Diagnostica dell’Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna di Brescia (IZSLER), sono stati prelevati complessivamente 1504 campioni di feci di cinghiale provenienti da 4 settori venatori della provincia di Brescia (Figura 1) durante tre stagioni di caccia. Per ciascun soggetto sono stati registrati il genere e l’età (Tabella 1).



**Figura 1** Rappresentazione dei quattro settori venatori che formano l’area di studio.  
**Figure 1** Map of the four hunting areas that formed the study area.

**Tabella 1** Distribuzione dei cinghiali per struttura di popolazione nei settori di caccia e nelle stagioni venatorie.  
**Table 1** Distribution of wild boar by age class, gender, hunting areas and hunting seasons

|                    | Fattore                          | N   | Giovani (%) | Sub-adulti (%) | Adulti (%) | Femmine (%) | Maschi (%) |
|--------------------|----------------------------------|-----|-------------|----------------|------------|-------------|------------|
| Settore            | Ambito Territoriale Caccia (ATC) | 506 | 10,47       | 24,11          | 65,42      | 56,72       | 43,28      |
|                    | Comprensorio Alpino (CA) 6       | 63  | 28,57       | 28,57          | 42,86      | 38,10       | 61,90      |
|                    | CA 7                             | 79  | 29,11       | 25,32          | 45,57      | 49,37       | 50,63      |
|                    | CA 8                             | 856 | 29,32       | 24,30          | 46,38      | 52,80       | 47,20      |
| Stagioni venatorie | 2017-2018                        | 525 | 19,24       | 26,29          | 54,48      | 54,29       | 45,71      |
|                    | 2018-2019                        | 381 | 23,36       | 18,37          | 58,27      | 49,34       | 50,66      |
|                    | 2019-2020                        | 598 | 25,92       | 26,76          | 47,32      | 55,02       | 44,98      |

Parallelamente, sono stati raccolti un totale di 80 campioni di feci di suini durante 4 anni di studio (2017-2020) (Tabella 2). In particolare, i soggetti conferiti presentavano sintomatologia gastro-enterica o diarrea e provenivano da 80 aziende (ingrasso = 33, riproduzione = 47; media dei capi = 3572; consistenza media = 4038 capi) della provincia di Brescia.

**Tabella 2** Numero di campioni fecali di suino (N) analizzati per ciascun anno di studio; ogni campione proviene da un soggetto diverso.

**Table 2** Number of pig faecal samples (N) collected per year. Each sample came from a different pig.

| Anno di conferimento | N  |
|----------------------|----|
| 2017                 | 6  |
| 2018                 | 45 |
| 2019                 | 17 |
| 2020                 | 12 |

#### *Isolamento e identificazione di E. coli ESBL/AmpC positivi*

L'identificazione dei ceppi isolati dai cinghiali è stata effettuata secondo un procedimento che prevede una fase di pre-aricchimento stemperando un'aliquota di materiale in acqua peptonata tamponata in rapporto 1:10. Dopo aver incubato il campione a  $37\pm1^{\circ}\text{C}$  per 18-22 ore viene eseguito un trapianto su una piastra di agar MacConkey addizionato di 1 mg/L di cefotaxime per garantire l'isolamento di batteri ESBL/AmpC (Van Damme et al., 2017). Sulla base della colorazione e della morfologia sono state selezionate le colonie sospette che sono state successivamente sottoposte a caratterizzazione molecolare.

#### *Analisi dei geni di resistenza*

Una singola colonia batterica di ogni campione positivo alla prova microbiologica è stata risospesa in 250µl di acqua DNase-Rnase free e il DNA è stato estratto attraverso lisi-bollitura ( $98^{\circ}\text{C}$  per 10minuti). L'identificazione di *E. coli* è stata condotta tramite analisi del gruppo filogenetico in PCR (dati non mostrati) mentre il rilevamento dei geni di resistenza è stato eseguito con un altro pannello di reazioni. Nello specifico, una PCR multipla è stata utilizzata per l'identificazione dei geni del gruppo CTX-M (Woodford et al., 2006); PCR singole sono state utilizzate per il gene SHV (Arlet et al., 1997), il TEM (Mabilat et al., 1990) e il CMY (Dierikx et al., 2010). Tutti gli ampliconi risultati positivi ai geni TEM e SHV sono stati sequenziati (Baldo et al., 2020).

#### *Analisi statistica*

Per i cinghiali, l'analisi statistica è stata condotta su tre livelli: analisi descrittiva dei soggetti abbattuti, stima della prevalenza apparente con i relativi intervalli di confidenza stimati con metodo esatto, analisi dei fattori associati alla prevalenza. Gli esiti (positivo/negativo) dell'analisi microbiologica e della ricerca di ciascun gene sono stati analizzati tramite modelli di regressione logistica (GLM). Il modello stima la probabilità del cinghiale di essere positivo in base alle covariate: genere, età, settore di caccia e stagione venatoria. I modelli sono stati confrontati con il Likelihood Ratio Test (LRT).

Rispetto ai maiali, lo studio è ancora in fase preliminare per cui è stata condotta la sola analisi descrittiva con la stima della prevalenza apparente. Inoltre, è stato effettuato il confronto tra le prevalenze riscontrate in cinghiali e suini tramite il test binomiale esatto.

Le analisi statistiche sono state condotte con il software R versione 4.0.3 (R Core Team, 2020).

I risultati sono stati considerati statisticamente significativi se il p-value (p) è minore di 0,05.

## RISULTATI

Dall'analisi microbiologica dei cinghiali è emersa una prevalenza complessiva di *E. coli* ESBL/AmpC del 15,96% (240/1504, 95% C.I. 14,14% – 17,91%). L'analisi statistica ha messo in evidenza che l'età dei soggetti, la stagione venatoria e i settori di caccia hanno un effetto sulla probabilità che un soggetto risulti positivo al test (Tabella 3). Infatti, nei giovani è stata riscontrata una probabilità maggiore di avere *E. coli* ESBL/AmpC rispetto agli adulti ( $p=0,0207$ ) e ai sub-adulti ( $p=0,0098$ ). Nei cinghiali abbattuti nella stagione venatoria 2017-2018 la probabilità di essere positivo è significativamente maggiore rispetto a quelli della stagione venatoria 2018-2019 ( $p=0,0232$ ) e 2019-2020 ( $p=0,0015$ ). I cinghiali abbattuti nel CA7 hanno una probabilità maggiore di avere *E. coli* ESBL/AmpC rispetto a quelli del CA8 ( $p=0,0033$ ) (Tabella 3). Non sono emerse altre differenze significative ( $p>0,05$ ).

**Tabella 3** Prevalenze di *E. coli* ESBL/AmpC nei cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagione venatoria e settore di caccia.

**Table 3** Results of ESBL/AmpC-producing *E. coli* in wild boars by gender, age class, hunting season and hunting area.

| Fattore            |            | Positivi | Totale | Prevalenza % | 95% C.I.       |
|--------------------|------------|----------|--------|--------------|----------------|
| Genere             | Femmina    | 129      | 802    | 16,08        | 13,61 – 18,81% |
|                    | Maschio    | 111      | 702    | 15,81        | 13,19 – 18,72% |
| Classe di età      | Giovani    | 71       | 345    | 20,58        | 16,44 – 25,24% |
|                    | Sub-adulti | 49       | 368    | 13,32        | 10,02 – 17,22% |
|                    | Adulti     | 120      | 791    | 15,17        | 12,74 – 17,86% |
| Stagione venatoria | 2017-2018  | 108      | 525    | 20,57        | 17,19 – 24,29% |
|                    | 2018-2019  | 55       | 381    | 14,44        | 11,06 – 18,37% |
|                    | 2019-2020  | 77       | 598    | 12,88        | 10,30 – 15,83% |
| Settore            | ATC Unico  | 83       | 506    | 16,40        | 13,28 – 19,92% |
|                    | CA 6       | 11       | 63     | 17,46        | 9,05 – 29,10%  |
|                    | CA 7       | 22       | 79     | 27,85        | 18,35 – 39,07% |
|                    | CA 8       | 124      | 856    | 14,49        | 12,20 – 17,02% |

Rispetto ai geni di resistenza, la prevalenza complessiva del CTX-M nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 12,3% (185/1504, 95% C.I. 10,68% – 14,07%). Dal modello statistico emerge che la stagione venatoria e la classe di età hanno un effetto sulla presenza di questo gene (Tabella 4). Infatti, nei ceppi isolati nei giovani c'è una probabilità maggiore di riscontrare il CTX-M rispetto a quelli dei sub-adulti ( $p=0,0197$ ) e degli adulti ( $p=0,0090$ ) (Tabella 4). I soggetti abbattuti nel 2017-2018 hanno una prevalenza di questo gene significativamente maggiore rispetto a quelli del 2019-2020 ( $p=0,0005$ ). Non sono emerse altre differenze statisticamente significative ( $p>0,05$ ).

**Tabella 4** Prevalenze del gene CTX-M riscontrate nei *E. coli* isolati dai cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagioni venatorie e settore di caccia.

**Table 4** Prevalence of the CTX-M gene found in *E. coli* isolated from wild boar, by gender, age class, hunting season and hunting area.

| Fattore            |            | Positivi | Totale | Prevalenza % | 95% C. I.      |
|--------------------|------------|----------|--------|--------------|----------------|
| Genere             | Femmina    | 96       | 802    | 11,97        | 9,8 – 14,42%   |
|                    | Maschio    | 89       | 702    | 12,68        | 10,31 – 15,37% |
| Classe di età      | Giovani    | 57       | 345    | 16,52        | 12,76 – 20,87% |
|                    | Sub-adulti | 37       | 368    | 10,05        | 7,18 – 13,59%  |
|                    | Adulti     | 91       | 791    | 11,5         | 9,36 – 13,94%  |
| Stagione venatoria | 2017-2018  | 84       | 525    | 16,00        | 12,97 – 19,42% |
|                    | 2018-2019  | 48       | 381    | 12,60        | 9,44 – 16,35%  |
|                    | 2019-2020  | 53       | 598    | 8,86         | 6,71 – 11,43%  |
| Settore            | ATC Unico  | 66       | 506    | 13,04        | 10,23 – 16,29% |
|                    | CA 6       | 10       | 63     | 15,87        | 7,88 – 27,26%  |
|                    | CA 7       | 14       | 79     | 17,72        | 10,04 – 27,94% |
|                    | CA 8       | 95       | 856    | 11,10        | 9,07 – 13,40%  |

Per il gene di resistenza CMY, la prevalenza complessiva emersa nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 0,86% (13/1504, 95% C.I. 0,46% - 1,47%). Dall'analisi statistica non sono emersi effetti significativi ( $p>0,05$ ). Rispetto al gene di resistenza SHV, la prevalenza apparente emersa nei *E. coli* isolati nei cinghiali è del 0,47% (7/1504, 95% C.I. 0,19% – 0,96%). L'analisi delle sequenze degli ampliconi ha messo in evidenza la presenza di SHV-12 (7/7). Dal modello statistico non sono emersi effetti significativi ( $p>0,05$ ).

Per il gene di resistenza TEM, la prevalenza apparente riscontrata è del 6,98% (105/1504, 95% C.I. 5,74% - 8,39%). L'analisi delle sequenze degli ampliconi ( $n=98$ , in sette casi non è stato possibile effettuare il sequenziamento) ha messo in evidenza la presenza di TEM-1 e sue varianti (92/98), TEM-33 (1/98), TEM-135 (2/98), TEM-176 (3/98). La stagione venatoria influenza la probabilità di riscontrare il gene: i soggetti abbattuti nella stagione venatoria 2017-2018 hanno una prevalenza di questo gene significativamente maggiore rispetto a quelli abbattuti nella stagione venatoria 2018-2019 ( $p=0,0186$ ) e 2019-2020 ( $p=0,0368$ ) (Tabella 5). Non sono emerse altre differenze statisticamente significative ( $p>0,05$ ).



**Tabella 5** Prevalenze del gene TEM riscontrate nei *E. coli* isolati dai cinghiali, suddivise per genere, classe di età, stagioni venatorie e settore di caccia.

**Table 5** Prevalence of the TEM gene found in *E. coli* isolated from wild boar, by gender, age class, hunting season and hunting area.

| Fattore            |            | Positivi | Totale | Prevalenza % | 95% C. I.     |
|--------------------|------------|----------|--------|--------------|---------------|
| Genere             | Femmina    | 58       | 802    | 7,23         | 5,54 – 9,25%  |
|                    | Maschio    | 47       | 702    | 6,70         | 4,96 – 8,80%  |
| Classe di età      | Giovani    | 27       | 345    | 7,83         | 5,22 – 11,18% |
|                    | Sub-adulti | 19       | 368    | 5,16         | 3,14 – 7,95%  |
|                    | Adulti     | 59       | 791    | 7,46         | 5,73 – 9,52%  |
| Stagione venatoria | 2017-2018  | 49       | 525    | 9,33         | 6,98 – 12,15% |
|                    | 2018-2019  | 21       | 381    | 5,51         | 3,44 – 8,30%  |
|                    | 2019-2020  | 35       | 598    | 5,85         | 4,11 – 8,05%  |
| Settore            | ATC Unico  | 46       | 506    | 9,09         | 6,73 – 11,94% |
|                    | CA 6       | 4        | 63     | 6,35         | 1,76 – 15,47% |
|                    | CA 7       | 7        | 79     | 8,86         | 3,64 – 17,41% |
|                    | CA 8       | 48       | 856    | 5,61         | 4,16 – 7,37%  |

Per quanto concerne le analisi molecolari sui maiali, la prevalenza apparente per il gene CTX-M è di 85% (68/80, 95% C.I. 75,26% – 92,00%), quella per SHV è di 6,25% (5/80, 95% C.I. 2,06% – 13,99%), 10% (8/80, 95% C.I. 4,42% - 18,76%) per il CMY e 55% (44/80, 95% C.I. 43,47% - 66,15%) per il gene TEM (Tabella 6).

**Tabella 6** Prevalenze dei singoli geni di resistenza riscontrati in *E. coli* nei maiali, suddivisi per anno di conferimento e tipologia di allevamento.

**Table 6** Prevalence of individual resistance genes found in *E. coli* from pigs by year of sample collection and breeding type.

| Fattore<br>CTX-M        |              | Prevalenza (%) |              |               |              |
|-------------------------|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|
|                         |              | SHV            | TEM          | CMY           |              |
| Anno di<br>conferimento | 2017         | 66,67 (4/6)    | 0 (0/6)      | 16,67 (1/6)   | 33,33 (2/6)  |
|                         | 2018         | 91,11 (41/45)  | 6,67 (3/45)  | 60 (27/45)    | 13,33 6/45)  |
|                         | 2019         | 76,47 (13/17)  | 11,76 (2/17) | 52,94 (9/17)  | 0 (0/17)     |
|                         | 2020         | 83,33 (10/12)  | 0 (0/12)     | 58,33 (7/12)  | 0 (0/12)     |
| Tipologia               | Ingrasso     | 90,91 (30/33)  | 0 (0/33)     | 60,61 (20/33) | 9,09 (3/33)  |
|                         | Riproduzione | 80,85 (38/47)  | 10,64 (5/47) | 51,06 (24/47) | 10,64 (5/47) |

Il confronto statistico tra le prevalenze dei geni di resistenza nelle due specie analizzate ha messo in evidenza una differenza significativa. In particolare, i valori riscontrati nei suini sono maggiori rispetto a quelli ottenuti nei cinghiali, rispettivamente per CTX-M, CMY, TEM e SHV ( $p < 0,001$ ).

## DISCUSSIONE

Il presente lavoro ha messo in evidenza una preoccupante diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC in entrambi i suidi analizzati. Le prevalenze maggiori sono state riscontrate nei maiali. Da un'analisi statistica più approfondita, condotta specificatamente sui cinghiali, è emerso che nei soggetti giovani c'è maggiore probabilità di riscontrare ceppi ESBL/AmpC e il gene di resistenza CTX-M rispetto alle altre classi di età e che nella stagione venatoria 2017-2018 la diffusione di questi, e del gene TEM, è stata maggiore rispetto alle altre due, 2018-2019 e 2019-2020.

Per quanto concerne la positività alla prova microbiologica e il riscontro dei geni di resistenza nei cinghiali, il presente studio conferma quanto già noto in letteratura per questa specie (Poeta et al., 2009; Alonso et al., 2017; Plaza-Rodríguez et al., 2021). Le prevalenze emerse risultano maggiori rispetto a quanto riscontrato in precedenza (Literak et al., 2010; Wasyl et al., 2018; Bonardi et al., 2019), tuttavia, l'assenza di una standardizzazione del metodo diagnostico rende difficoltosa la comparazione tra risultati di studi differenti (Tinoco Torres et al., 2020). I modelli statistici hanno messo in evidenza una maggiore diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC e del gene CTX-M negli animali giovani rispetto ai sub-adulti e adulti. Per quanto ci è noto, nell'unico lavoro disponibile in cui è stato condotto un confronto tra classi di età relativi alla diffusione di questi ceppi nei cinghiali non sono emerse differenze significative (Holtmann et al., 2021). Tuttavia, il fatto che i suinetti domestici abbiano una maggiore suscettibilità per i ceppi di *E. coli*, che possono causare enteriti gravi soprattutto a poche settimane di vita (Jiang et al., 2019), supporta l'ipotesi che anche i cinghiali più giovani possano avere una maggiore suscettibilità a questa infezione. Inoltre, per gli animali domestici è stato messo in evidenza che i piccoli potrebbero avere una maggiore predisposizione per questi ceppi a causa di una microflora intestinale non ancora pienamente sviluppata che potrebbe essere maggiormente esposta a nuove colonizzazioni batteriche (Pereira et al., 2014). La differenza di prevalenza dei ceppi ESBL/AmpC e dei geni CTX-M e TEM riscontrate tra stagioni venatorie potrebbe essere riconducibile al ruolo di indicatore ambientale del cinghiale. Infatti, premesso che una

delle cause principali dell'insorgenza di resistenza è l'uso eccessivo di antibiotici (Capozzi et al., 2019) e considerando il noto ruolo di “conduttore” svolto dall'ambiente nella trasmissione di geni di resistenza e di ceppi patogeni (Graham et al., 2019), sembrerebbe che fino al 2017 l'ecosistema frequentato dai cinghiali fosse più contaminato da batteri resistenti rispetto agli anni successivi. In questo senso va tenuta in considerazione anche la caratteristica intrinseca della dieta del cinghiale ovvero di essere un onnivoro opportunista che può modificare anche drasticamente la sua alimentazione in base alla disponibilità di cibo. Tuttavia, con i dati al momento disponibili non risulta possibile trarre delle conclusioni robuste rispetto a queste variazioni di prevalenza, alla luce anche della sorprendente rapidità con cui si è verificato il cambiamento di trend tra stagioni venatorie.

Rispetto ai risultati emersi nei maiali, va osservato che, anche in questo caso, le prevalenze dei geni di resistenza confermano quanto già noto in letteratura, anche se nel presente studio sono stati riscontrati dei valori più alti rispetto a quelli delle indagini precedenti (Gao et al., 2015; Bergšpica et al., 2020). L'ipotesi principale è che le resistenze riscontrate possano essere ascrivibili all'eccessivo uso di antibiotici (EMA e EFSA, 2017), che spiegherebbe anche le differenze significative con le prevalenze riscontrate nel cinghiale. Tuttavia, lo studio ancora in fase preliminare non permette di trarre considerazioni e valutazioni concrete sui maiali anche rispetto alle potenziali differenze di prevalenza tra gli anni e le tipologie di allevamento.

## CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha messo in evidenza la diffusione di *E. coli* ESBL/AmpC in suidi domestici e selvatici della provincia di Brescia. Rispetto ai cinghiali, sarebbe auspicabile la prosecuzione delle analisi al fine di creare serie storiche di dati per monitorare l'andamento temporale della diffusione dei ceppi e dei geni di AMR, idealmente affiancate da indagini atte a valutare il grado di contaminazione antimicrobica dell'ambiente. In questo senso, ulteriori analisi si rendono necessarie per selezionare all'interno dei comprensori di caccia gli allevamenti di suini, utilizzando come punto di partenza i risultati preliminari ottenuti sui maiali, e le zone di smaltimento dei liquami per pianificare un'ulteriore specifica raccolta di campioni di feci. In particolare, l'obiettivo sarebbe quello di valutare le prevalenze di *E. coli* ESBL/AmpC in territori condivisi con il cinghiale, con il fine ultimo di valutare se e quanto la presenza di questi ceppi negli animali domestici e nell'ambiente possa influenzarne la diffusione nella specie selvatica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Agersø Y., 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.
2. Alonso C.A., González-Barrio D., Ruiz-Fons F., Ruiz-Ripa L., Torres C. (2017) “High frequency of B2 phylogroup among non-clonally related fecal *Escherichia coli* isolates from wild boars, including the lineage ST131”. *FEMS Microbiol Ecol.* 93, fix016.
3. Arlet G., Rouveau M., Philippon A. (1997) “Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase”. *FEMS Microbiol Lett.* 152, 163-67.
4. Baldo V., Salogni C., Giovannini S., D'Incau M., Boniotti M.B., Birbes L., Pitozzi A., Formenti N., Grassi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2020) “Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis”. *Front Vet Sci.* 7, 545818.
5. Bergšpica I., Kaprou G., Alexa EA, Prieto M, Alvarez-Ordóñez A (2020) “Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia coli* in Pigs and Pork Meat in the

- European Union". *Antibiotics*. **9**, 678.
6. Bonardi S., Cabassi C.S., Longhi S., Pia F., Corradi M., Gilioli S., Scaltriti E. (2019) "Detection of Extended- Spectrum Beta-Lactamase producing *Escherichia coli* from mesenteric lymph nodes of wild boars (*Sus scrofa*)". *Ital J Food Saf.* **7**.
  7. Capozzi C., Maurici M., Panà A. (2019) "Antimicrobial resistance: it is a global crisis, "a slow tsunami"". *Ig Sanita Pubbl.* **75**, 429-450.
  8. Dahms C., Hubner N.O., Kossow A., Mellmann A., Dittmann K., Kramer A. (2015) "Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany". *PLoS One*; **10**, e0143326.
  9. Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. (2010) Increased detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet Microbiol.* **145**, 273–8. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.03.019
  10. EMA (European Medicines Agency), EFSA (European Food Safety Authority). (2017) "EMA and EFSA Joint Scientific Opinion on measures to reduce the need to use antimicrobial agents in animal husbandry in the European Union, and the resulting impacts on food safety (RONAFA)". [EMA/CVMP/570771/2015]. *EFSA J.* **15**, 4666, 245 pp.
  11. Gao L., Tan Y., Zhang X., Hu J., Miao Z., Wei L., Chai T. (2015) "Emissions of *Escherichia coli* Carrying Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Resistance from Pig Farms to the Surrounding Environment". *Int J Environ Res Public Health.* **12**, 4203-4213.
  12. Graham D.W., Bergeron G., Bourassa M.W., Dickson J., Gomes F., Howe A., Kahn L.H., Morley P.S., Scott H. M., Simjee S., Singer R.S., Smith T.C., Storrs C., Wittum T.E. (2019) "Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems". *Ann NY Acad Sci.* **1441**, 17-30.
  13. Heuer H., Schmitt H., Smalla K. (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields *Curr Opin Microbiol.* **14**, 236-243.
  14. Holtmann A.R., Meemken D., Müller A., Seinige D., Büttner K., Failing K., Kehrenberg C. (2021) "Wild Boars Carry Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase- and AmpC-Producing *Escherichia coli*". *Microorganisms.* **9**, 367
  15. Jiang F., Wu Z., Zheng Y., Frana T.S., Sahin O., Zhang Q., Li G. (2019) "Genotypes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Hemolytic *Escherichia coli* from Diarrheic Piglets". *Foodborne Pathog Dis.* **16**.
  16. Literak I., Dolejska M., Radimersky T., Klimes J., Friedman M., Aarestrup F.M., Hasman H., Cizek A. (2010) "Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars". *J Appl Microbiol.* **108**, 1702-11.
  17. Mabilat C., Goussard S., Sougakoff W., Spencer R.C., Courvalin P (1990) "Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extendedbroad-spectrum  $\beta$ -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumonia*". *Plasmid.* **23**, 27-34.
  18. Pereira R., Siler V.V., J. D, Bicalho R. C., Warnick L. D. (2014) "In Vivo Selection of Resistant *E. coli* after ingestion of Milk with Added Drug Residues". *PLoS ONE* **9**, e115223.
  19. Plaza-Rodríguez C., Alt K., Grobbel M., Hammerl J.A., Irrgang A., Szabo I., Stingl K., Schuh E., Wiehle L., Pfefferkorn B., Naumann S., Kaesbohrer A., Tenhagen B.-A. (2021) "Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany?" *Front Vet Sci.* **7**, 627821.
  20. Poeta P., Radhouani H., Pinto L., Martinho A., Rego V., Rodrigues R., Gonçalves A., Rodrigues J., Estepa V., Torres C., Igrejas G. (2009) "Wild boars as reservoirs of extended-

- spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups". J Basic Microbiol. 49, 584–588.
21. R Core Team. (2020) "R: A language and environment for statistical computing". R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria,. URL <https://www.R-project.org/>
  22. Tinoco Torres R., Fernandes J., Carvalho J., Cunha M.V., Caetano T., Mendo S., Serrano E., Fonseca C. (2020) "Wild boar as a reservoir of antimicrobial resistance". Sci Total Environ. 717, 135001.
  23. Vale A.P., Cousins C., Tzora A., McCarron M.-T., Green A., Molloy S., Bainbridge J., Leonard F. (2020) "Molecular characterization of fecal *Escherichia coli* isolated from zoo animals". J Zoo Wildl Med. 50, 813-821.
  24. Van Damme I., Garcia-Graells C., Biasino W., Gowda T., Botteldoorn N., De Zutter L. (2017) "High abundance and diversity of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in faeces and tonsils of pigs at slaughter". Vet Microbiol. 208, 190-4.
  25. von Salviati C., Laube H., Guerra B., Roesler U., Friese A. (2015) "Emission of ESBL/ AmpC-producing *Escherichia coli* from pig fattening farms to surrounding areas". Vet Microbiol. 175, 77-84.
  26. Woodford N., Fagan E.J., Ellington M.J. (2006) "Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases". J Antimicrob Chemother. 57, 154-5.
  27. Wasyl D., Zając M., Lalak A., Skarżyńska M., Samcik I., Kwit R., Jabłoński A., Bocian Ł., Woźniakowski G., Hoszowski A., Szulowski K. (2018) "Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland. Microb Drug Resist". 24, 807-815.
  28. Wu G., Day M.J., Mafura M.T., Nunez-Garcia J., Fenner J.J., Sharma M., van Essen-Zandbergen A., Rodríguez I., Dierikx C., Kadlec K., Schink A.-K., Wain J., Helmuth R., Guerra B., Schwarz S., Threlfall J., Woodward M.J., Woodford N., Coldham N., Mevius D. (2013) "Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and hu-mans from the UK, The Netherlands and Germany". PLoS ONE. 8, e75392.



# MALATTIA NEUROLOGICA IN SCROFE GESTANTI ASSOCIATA A PORCINE ASTROVIRUS TYPE 3: CASE REPORT

## NEUROLOGIC DISEASE IN GESTATING SOWS ASSOCIATED WITH PORCINE ASTROVIRUS TYPE 3: CASE REPORT

ROSIGNOLI C.<sup>1</sup>, GIBELLI L.<sup>2</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, PIGOLI C.<sup>2</sup>, MAROCCHI L.<sup>1</sup>,  
CALEFFI A.<sup>3</sup>, FACCINI S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-  
Sede territoriale di Mantova

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-  
Sede territoriale di Milano

<sup>3</sup> Medico Veterinario suiatra –Mantova

**Parole chiave:** *Astrovirus, suino, PoAstV3, encefalomyelitis*

**Key words:** *Astrovirus, swine, PoAstV3, encephalomyelitis*

### RIASSUNTO

Gli astrovirus sono agenti virali, ad habitat prevalentemente enterico, in grado di infettare l'uomo e una ampia gamma di specie animali. Nel suino ad oggi sono stati individuati 5 lineage (PoAstV1-PoAstV5). PoAstV3 è stato recentemente associato ad una malattia neurologica atipica in suini di varia età. Il presente report descrive, per la prima volta in Italia, dei casi di malattia neurologica associata a PoAstV3 in scrofe in gestazione.

### ABSTRACT

Astrovirus are viral agents, with mainly enteric habitat, able to infect humans and a wide range of animal species. In pigs, 5 lineages have been identified (PoAstV1-PoAstV5). PoAstV3 has recently been associated with atypical neurological disease in pigs of different ages. This report describes, for the first time in Italy, cases of neurologic disease associated with PoAstV3 in which gestating sows are involved.

### INTRODUZIONE

Gli astrovirus appartengono alla famiglia delle *Astroviridae*. Sono virus a RNA di piccole dimensioni, privi di envelope e vengono frequentemente rilevati nelle feci di volatili (Gen. *Avastrovirus*) e di diverse specie di mammiferi (Gen. *Mamastrovirus*), compreso l'uomo. L'infezione è spesso asintomatica ma, in alcuni casi, può dare origine a forme enteriche di gravità variabile (1). Recentemente gli astrovirus sono stati associati anche a casi di malattia neurologica nell'uomo, nella scimmia, nel bovino e nel suino (2). Gli astrovirus del suino sono distinti in 5 diversi lineages (PoAstV1-PoAstV5) (3). In particolare, PoAstV3 è stato identificato come probabile causa di gravi sintomatologie neurologiche in suini di varia età negli Stati Uniti (4, 5) e in suinetti svezzati in Ungheria (6).

Scopo del presente report è quello di descrivere, per la prima volta in Italia, dei casi di malattia neurologica grave in scrofe gestanti associata al rilievo, mediante Real-Time RT-PCR, di PoAstV3 nel sistema nervoso centrale.



## DESCRIZIONE DEL CASO

### Anamnesi

I casi di malattia neurologica hanno coinvolto un allevamento di circa 700 scrofe a ciclo aperto della provincia di Mantova. La patologia si è presentata in soggetti in gestazione. In questa fase gli animali erano alloggiati in ampi box con pavimentazione mista, grigliato e pavimento pieno. I primi episodi sono comparsi all'inizio di marzo 2021. Ad oggi, dopo circa 12 settimane, sono stati registrati 22 casi, tutti con il medesimo quadro clinico, in soggetti di varia età. Nel periodo in esame l'incidenza è risultata variabile da 0 a 3 casi a settimana, con un picco tra la fine di marzo e l'inizio di aprile 2021.

### Segni clinici

Inizialmente la scrofa colpita manifestava anoressia, testa abbassata, lentezza nei movimenti, barcollamento e atassia. In alcuni casi l'atteggiamento iniziale di difficoltà nella deambulazione poteva essere confuso per una zoppia agli arti anteriori o posteriori, ma poi il rapido aggravamento rendeva evidente il coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Seguiva infatti, in genere dopo 24-36 ore dalla comparsa dei primi sintomi, l'incapacità ad alzarsi e poi il decubito laterale permanente. In più casi l'allevatore trovava la scrofa già da subito in decubito permanente, prima sternale e poi laterale. Assenti tremori, movimenti di pedalamento o altri sintomi eccitativi. Qualsiasi intervento terapeutico, antibiotico e antinfiammatorio, non sortiva alcun risultato. La prognosi diventava quindi infausta e si procedeva all'eutanasia.

### Esami di laboratorio

Sono pervenute al laboratorio per accertamenti diagnostici le carcasse di due scrofe, una nel mese di aprile (scrofa A) e una nel mese di maggio (scrofa B). Nel corso dell'esame necroscopico non sono state riscontrate alterazioni di rilievo agli organi della cavità toracica, addominale e pelvica. Macroscopicamente, a livello encefalico, è stata evidenziata congestione dei vasi meningei.

L'esame batteriologico sugli organi interni e sull'encefalo ha permesso di escludere la presenza di infezioni batteriche setticemiche o comunque neuro-invasive.

L'esame istologico dei due encefali ha evidenziato un quadro di grave encefalite non suppurativa diffusa con presenza di manicotti perivascolari linfocitari, neuronofagia e gliosi. In una delle due scrofe (scrofa B) è stato effettuato anche il campionamento del midollo spinale nei tratti cervicale, toracico e lombare. L'esame istologico su questi tessuti ha rilevato la presenza di una grave mielite non suppurativa con quadri simili a quelli riscontrati nelle aree encefaliche.

Su campioni di tessuto del sistema nervoso centrale è stata effettuata la ricerca di PoAstV3 mediante one-step RT-Real-Time PCR (3). Entrambi gli encefali sono risultati positivi. Da sottolineare la positività dei tratti di midollo spinale della scrofa B con valori di Ct significativamente inferiori rispetto a quelli rilevati nei campioni prelevati dalle aree encefaliche (tabella 1). Non è stato rilevato l'RNA di PoAstV3 in campioni di polmone, fegato, rene, milza, linfonodo inguinale e contenuto intestinale di entrambi i soggetti.

Per quanto riguarda la diagnosi differenziale, nel sistema nervoso centrale non sono stati rilevati mediante PCR il virus di Aujeszky, PRRSv, PCV2, PCV3, PCV4, EMCV e agenti virali appartenenti al genere Pestivirus.

| Campione                  | Esiti RT-PCR per PoAstV3 (valore Ct)           |               |
|---------------------------|------------------------------------------------|---------------|
|                           | Scrofa A                                       | Scrofa B      |
| Cervello                  | Positivo (33)<br>pool dalle 3 aree encefaliche | Positivo (34) |
| Cervelletto               |                                                | Positivo (31) |
| Tronco                    |                                                | Positivo (35) |
| Midollo spinale cervicale | NE                                             | Positivo (26) |
| Midollo spinale toracico  | NE                                             | Positivo (23) |
| Midollo spinale lombare   | NE                                             | Positivo (25) |

**Tab. 1:** esiti della RT-Real-Time PCR per PoAstV3 su campioni prelevati da diverse parti del sistema nervoso centrale (NE=non eseguito; Ct= numero di cicli necessari per rilevare PoAstV3 nel campione).

**Tab.1:** RT-Real-Time PCR tests results for PoAstV3 in samples from different parts of the central nervous system (NE= not done; Ct=cycle threshold value).

## DISCUSSIONE

In questo report vengono descritti casi di patologia neurologica grave in scrofe adulte associata alla presenza di PoAstV3 nel sistema nervoso centrale. Ulteriori approfondimenti sono necessari, come l'applicazione della tecnica di ibridizzazione in situ e il sequenziamento metagenomico, per meglio definire la correlazione tra le lesioni rilevate in sede microscopica e PoAstV3.

Gli episodi hanno coinvolto soggetti nella fase di gestazione. Nessun caso, nello stesso periodo, è stato riscontrato in suinetti neonati o svezzati dello stesso allevamento. Il decubito laterale permanente preceduto da deambulazione incerta e atassia sono risultati i segni clinici più rappresentativi di questa particolare forma neurologica. Il quadro istologico è quello di una encefalomyelitis non suppurativa grave. I sintomi clinici e i riscontri di laboratorio depongono per un importante coinvolgimento del midollo spinale. Nessun animale tra quelli colpiti è giunto a guarigione. Considerando il numero totale medio di scrofe dell'allevamento, l'incidenza della malattia, nei tre mesi di osservazione, è stata pari al 3,1%.

## CONCLUSIONI

La malattia neurologica nel suino da PoAstV3 è considerata negli Stati Uniti una patologia emergente (7). In Italia ulteriori riscontri sono necessari per confermare questo dato. E' opportuno quindi attuare un attento monitoraggio e inserire la ricerca di PoAstV3 nella diagnosi differenziale quando si presentano soggetti giovani o adulti con difficoltà nella deambulazione seguita da decubito laterale permanente.

Diversi aspetti di questa infezione virale neuro-invasiva sono ad oggi ancora sconosciuti. Attualmente, ad esempio, non è ancora stato possibile riprodurre sperimentalmente la malattia e quindi poco si sa sulla patogenesi. Auspicabili sono inoltre studi per meglio definire l'ecologia del virus e l'epidemiologia dell'infezione nel suino oltre che per individuare eventuali modalità di profilassi e controllo della malattia neurologica associata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Rawal G., Linhares D. (2021) Scoping review on the epidemiology, diagnostics, and clinical significance of porcine astroviruses. *Authorea*. February 08, 2021. DOI: [10.22541/au.161272417.78961113/v2](https://doi.org/10.22541/au.161272417.78961113/v2).
2. Rawal, G., Matias, F.F., Macedo, N.R., Bradner, L.K., Harmon, K.M., Allison, G., Arruda, B.L. (2020). Ecology of Porcine Astrovirus Type 3 on a Swine Farm with Associated Neurologic Disease. *Viruses*, 12 (9):992. <https://doi.org/10.3390/v12090992>
3. Xiao, C.T., Giménez-Lirola, L.G., Gerber, P.F., Jiang, Y.H., Halbur, P.G., Opriessnig, T. (2013). Identification and characterization of novel porcine astroviruses (PAstVs) with high prevalence and frequent co-infection of individual pigs with multiple PAstV types. *J Gen Virol*, 94 :570–582. 10.1099/vir.0.048744-0
4. Arruda B., Arruda P., Hensch M., Chen, Q., Zheng, Y., Yang, C., Ganwu, L. (2017). Porcine Astrovirus Type 3 in Central Nervous System of Swine with Polioencephalomyelitis. *Emerg Infect Dis*, 23 (12):2097-2100. 10.3201/eid2312.170703
5. Matias, F.F.; Bradner, L.K.; Burrough, E.R.; Cooper, V.L.; Derscheid, R.J.; Gauger, P.C.; Harmon, K.M.; Madson, D.; Piñeyro, P.E.; Schwartz, K.J.; et al. (2019) Polioencephalomyelitis in Domestic Swine Associated with Porcine Astrovirus Type 3. *Vet. Pathol*.
6. Boros, A., Albert, M., Pankovics, P., Biro, H., Pesavento, P.A., Phan, T.G., Delvart E., Reuter, G. (2017). Outbreaks of Neuroinvasive Astrovirus Associated with Encephalomyelitis, Weakness, and Paralysis among Weaned Pigs, Hungary. *Emerg Infect Dis*, 23 (12):1999-2010. 10.3201/eid2312.170804
7. Rawal, G.; Matias, F.F.; Mueller, A.; Allison, G.; Hedberg, W.; Macedo, N.; Bradner, L.; Harmon, K.; Linhares, D.; Arruda, B. Porcine astrovirus type 3 is an emerging cause of atypical neurologic disease: Diagnostic cases and infection dynamics on affected flows. In *Proceedings of the 50th Annual Meeting of the American Association of Swine Veterinarians (AASV)*, Orlando, FL, USA, 9–12 March 2019.

# **ESCHERICHIA COLI ENTEROTOSSIGENI ISOLATI DA FOCOLAI DI COLIBACILLOSI ENTERICA POST-SVEZZAMENTO**

## **ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM OUTBREAKS OF POST WEANING ENTERIC COLIBACILLOSIS**

TORREGGIANI C., TORRI D., MAIOLI G., PROSPERI A., CHIAPPONI C.,  
BONILAURI P., GHERPELLI Y., MANFREDI R., DOTTORI M., LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, IZSLER*

**Parole chiave:** ETEC, Fattori di virulenza, Colibacillosi enterica post-svezzamento

**Key Words:** ETEC, Virulence factors, Post-weaning enteric colibacillosis

### **RIASSUNTO**

Il presente studio riporta la prevalenza dei diversi virotipi di *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) isolati nell'anno 2019 da 182 focolai di diarrea post svezzamento (PWD) presentatisi in altrettante aziende suinicole Italiane. La diagnosi di colibacillosi enterica è stata confermata dall'esame batteriologico eseguito da campioni di tamponi rettali e contenuto intestinale; i ceppi sono stati genotipizzati impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine (tossine termostabili, STa e STb, tossina termolabile, LT e tossina Shiga-like, (Stx2e). Tutti i ceppi di *E. coli* isolati, per un totale di 182 ETEC, erano emolitici e la prevalenza delle principali fimbrie e tossine tra i ceppi inclusi nello studio è risultata essere: F4 (41.3%), F18 (58.7%), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) and Stx2e (10.8%). Il virotipo isolato più frequentemente è stato F18 STa STb (29.1%), seguito da F4 STa STb (14.3%).

### **ABSTRACT**

In the present study, the virotype's prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from 182 outbreaks of post weaning diarrhoea (PWD) occurred in as many as pig farms in Italy in 2019 was reported. The diagnosis of enteric colibacillosis was confirmed by bacteriological examination from samples of rectal swabs and luminal contents. Strains were genotyped using a multiplex PCR method for genes coding for F4, F5, F6, F18, F41 and for toxins (thermostable toxins, STa and STb, thermolabile toxin, LT and Shiga-like toxin, Stx2e). All the 182 *E. coli* strains isolated were haemolytic and the prevalence of the main fimbriae and toxins among the strains included in the study were: F4 (41.3%), F18 (58.7%), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) and Stx2e (10.8%). The most frequently isolated virotype was F18 STa STb (29.1%), followed by F4 STa STb (14.3%).

### **INTRODUZIONE**

La diarrea post svezzamento (PWD) rappresenta una delle principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino, per l' aumento della mortalità e nei soggetti che superano la fase acuta della malattia, diminuzione di incremento ponderale e peggioramento delle performances produttive, oltre ad un aumento dei costi per l'acquisto di farmaci antibiotici.

I ceppi di *Escherichia coli* enterotossici (ETEC) sono una delle più importanti cause di PWD e rappresentano un patotipo dotato di adesine fimbriali che mediano l'adesione del

batterio a recettori specifici localizzati sugli enterociti intestinali del suino ed enterotossine che alterano l'omeostasi del piccolo intestino, causando un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume e determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD. Nei casi di PWD si osserva anoressia o disoressia con comparsa di diarrea acquosa pochi giorni dopo lo svezzamento a cui si associa marcata disidratazione, diminuzione delle performances produttive e aumento della mortalità. Talvolta la comparsa di diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa.

Gli ETEC responsabili della diarrea post-svezzamento presentano generalmente fimbrie F4 (K88) o F18. Molto raramente possono essere isolati ceppi con fimbrie F5, F6 e F41, che tipicamente sono responsabili della colibacillosi enterica in suinetti sottoscrofa. Le principali enterotossine prodotte dagli ETEC del suino, chiave del meccanismo patogenetico della colibacillosi, sono la tossina termolabile (LT) e due tossine termostabili (STa e STb).

Le fimbrie F4 a loro volta si suddividono in F4ab, F4ac e F4ad, sebbene la maggior parte dei casi di PWD sia causata da ceppi di *E. coli* F4ac. Le fimbrie F18 invece possiedono due varianti antigeniche ovvero F18ab, presente generalmente nella malattia degli edemi e la variante F18ac, associata a casi di PWD. Il virotipo è determinato dalla combinazione dei diversi fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie e tossine. La circolazione dei diversi virotipi di ETEC responsabili dei casi di colibacillosi enterica in una determinata area geografica o sistema produttivo, è una condizione dinamica, con possibilità di forti variazioni nel tempo (Luppi et al., 2014). L'obiettivo di questo studio è stato quello di descrivere la prevalenza dei geni di virulenza in ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD in Italia nell'anno 2019.

## **MATERIALI E METODI**

Nel corso del 2019 sono stati isolati presso le sezioni diagnostiche di Reggio Emilia e Parma dell'IZSLER 182 ceppi di *Escherichia coli* enterotossigeni da altrettanti focolai di PWD osservati in aziende suinicole italiane.

Tali ceppi sono stati isolati da materiale patologico costituito da contenuto intestinale e tamponi rettali prelevati da suini con quadri clinici riferibili a colibacillosi enterica, insorti 1-3 settimane post svezzamento. I tamponi rettali o il contenuto degli intestini sono stati seminati su terreno Agar sangue e su Gassner agar e incubati per 18-24 ore a 37°C in ambiente aerobio. In seguito al periodo di incubazione previsto è stata eseguita una valutazione morfologica e quantitativa delle colonie cresciute sui terreni culturali citati. In particolare, è stata valutata la presenza di emolisi su Agar sangue, infatti, a questo proposito, occorre sottolineare che la maggior parte degli ETEC isolati da casi di diarrea post-svezzamento sono emolitici quando coltivati su terreni a base di sangue. E' stata considerata significativa per la diagnosi di colibacillosi la crescita in coltura pura o quando la percentuale delle colonie di *E. coli* patogeno presenti in coltura erano  $\geq 70\%$ . Successivamente alla valutazione morfologica e la conferma biochimica, per ogni ceppo di *E. coli*, è stata eseguita la genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine Sta, STb, LT e Stx2e (Casey and Bosworth, 2009). I ceppi sono stati classificati come ETEC se in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie ed uno per le tossine. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti ceppi appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico isolato nel calcolo della prevalenza.

## **RISULTATI**

Tutti i ceppi di *E. coli* isolati (182) si presentavano emolitici su terreno Agar sangue con

prevalenza delle fimbrie e delle tossine così distribuita: F4 (41.3 %), F18 (58.7 %), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) e Stx2e (10.8%). Come descritto precedentemente con il termine virotipo si intende la combinazione dei diversi fattori di virulenza che caratterizzano un ceppo all'interno di un patotipo. Dall'analisi dei risultati della genotipizzazione condotta nel presente studio risulta che il virotipo F18 STa STb, presente nel 29.1% dei casi, risultava quello isolato più frequentemente, seguito da F4 STa STb osservato invece nel 14.3% (Tabella 1). Nell'8.2% dei casi sono stati osservati focolai misti con isolamento di due virotipi differenti per la tipologia delle fimbrie (F4 e F18).

**Tabella 1.** Frequenza dei diversi virotipi ETEC isolati.

**Table 1.** ETEC virotypes' prevalence.

| Virotipo             | %    |
|----------------------|------|
| F18 STa STb          | 29.1 |
| F4 STa STb           | 14.3 |
| F18 STa STb LT       | 9.9  |
| F18 STa STb Stx2e    | 7.7  |
| F18 STa              | 7.1  |
| F4 STb LT            | 7.1  |
| F4 STb               | 6.6  |
| F4 STa STb LT        | 4.4  |
| F4 STa               | 3.4  |
| F4 STa LT            | 2.8  |
| F4 LT                | 2.7  |
| F18 STa STX2e        | 1.7  |
| F18 STb              | 1.2  |
| F18 STa STb LT Stx2e | 1    |
| F18 STa LT           | 0.5  |
| F18 STx2e            | 0.5  |

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio offre un quadro sulla prevalenza dei virotipi di ETEC isolati da 182 focolai di colibacillosi enterica in Italia nell'anno 2019. Il dato che dev'essere discusso riguarda la prevalenza dei ceppi F18 e F4 che come noto sono i principali responsabili delle forme di colibacillosi che si verificano nel post-svezzamento. Dai risultati ottenuti si osserva che i ceppi ETEC F18 mostrano una maggiore frequenza, nei casi di colibacillosi enterica, rispetto agli ETEC F4. Questi dati evidenziano una variazione nella dinamica della circolazione dei ceppi ETEC responsabili della colibacillosi enterica del suino, considerando che precedenti studi sull'argomento dimostravano una netta prevalenza di ETEC F4 in casi di colibacillosi post-svezzamento. Dati di prevalenza provenienti da casi di colibacillosi in allevamenti italiani indicano che ETEC F4 nel 2002 era responsabile dell'89.2% dei focolai (Luppi et al., 2014). Nello stesso studio, riportante i dati d'isolamento e tipizzazione di ceppi ETEC fino al 2012 si osservava già un graduale

spostamento della prevalenza verso ceppi con fimbrie F18, con una percentuale di casi sostenuti da ceppi ETEC F4 nel 2012 pari al 64.4% . In un recente studio pubblicato nel 2016 ETEC F4 era il ceppo più comunemente isolato in casi di PWD in Olanda, Francia, Germania e Italia (45,1% dei casi), contro un'incidenza del 33,9% per i ceppi ETEC F18 (Luppi et al., 2016). Risultati simili, a favore di una maggiore prevalenza di ETEC F4, sono stati riportati in indagini meno recenti eseguite in Danimarca (Frydendahl, 2002), Polonia (Osek et al., 2000) e Ungheria (Zajacova et al., 2012).

Le informazioni presentate in questo studio evidenziano la variabilità della prevalenza dei virotipi ETEC in focolai di colibacillosi enterica nel corso del tempo. Gli elementi che possono essere ipotizzati come responsabili di un'alternanza di diversi virotipi sono imputabili a diversi aspetti, tra i quali si possono annoverare fattori legati all'ospite, come ad esempio specifiche caratteristiche genetiche che modulano la presenza di specifici recettori a livello intestinale per le fimbrie degli ETEC (Bao et al., 2008), interventi profilattici come ad esempio la vaccinazione, fattori alimentari e fattori dipendenti dall'agente eziologico come ad esempio la resistenza agli antibiotici.

E' stata dimostrata l'esistenza di geni che controllano l'espressione dei recettori intestinali del suino per ETEC, l'assenza di questi recettori determina tra i suini genotipi ETEC resistenti. Per ETEC F4, polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) situato sui geni Mucin4 (MUC4), Mucin 13 (MUC13), Mucin 20 (MUC20), recettore della transferrina (TFRC), non-recettore tirosina chinasi 2 (ACK1) oltre ad altri, sono stati proposti come marcatori genetici per la resistenza / suscettibilità ETEC nel suino.

Una maggiore prevalenza di suini con genotipo MUC4 sensibile è stato osservato in razze commerciali, come Large White e Landrace, mentre una frequenza più bassa dell'allele sensibile è stata segnalata nelle razze locali (Luise et al., 2019).

Tuttavia, la correlazione tra il polimorfismo MUC4 e la suscettibilità per ETEC F4 non è del tutto coerente, in particolare per la resistenza, infatti una certa percentuale di suini con genotipo MUC4 resistente mostrano adesione intestinale di ETEC con fimbrie F4ac. Altri geni tra cui MUC13, MUC20 e TFRC hanno quindi attirato l'attenzione dei ricercatori, per il possibile ruolo nella resistenza genetica nei confronti di ETEC F4 (Fairbrother and Gyles, 2012).

Per quanto riguarda la resistenza dei suini all'infezione da ETEC F18, i ricercatori hanno raggiunto la convergenza maggiore per un SNP situato sul gene FUT1. Bao et al. ha dimostrato che, per la maggior parte, le razze Duroc e Pietrain hanno presentato il genotipo FUT1 resistente mentre il cinghiale e razze Cinesi hanno mostrato esclusivamente genotipi sensibili.

In alcuni paesi come la Danimarca esistono programmi di selezione per la resistenza verso F4, tutto ciò ha comportato una riduzione dei soggetti sensibili a ETEC F4 nella popolazione suina danese (Luise et al, 2019). A questo proposito l'aumento della presenza di loci di resistenza per F18 e F4 nella popolazione suina, attraverso la selezione, è un approccio sicuramente interessante per prevenire la PWD da ETEC. Tuttavia, è importante sottolineare come esista la possibilità di co-selezione di caratteri fenotipici indesiderati strettamente connessi con i genotipi F4 e F18 resistenti (Fairbrother and Gyles, 2012)..

Altri fattori che interverrebbero sulla modulazione dei recettori fimbriali sono alcuni componenti alimentari, come ad esempio le lectine, proteine di cui ne sono soprattutto ricchi i cereali e le leguminose (Kelly et al., 1994).

Da qualche anno, per il controllo della colibacillosi enterica nel post-svezzamento, viene impiegata la vaccinazione con ceppi naturalmente avirulenti, prima in forma monovalente (F4), poi bivalente (F4/F18) per via orale. Tale strategia vaccinale ha



lo scopo di immunizzare i suinetti prima dell'inizio del periodo post svezzamento, stimolando un'immunità mucosale, attraverso la produzione di IgA a livello intestinale. E' difficile stabilire se ed eventualmente quanto, l'impiego dei vaccini sopraccitati abbia potuto influenzare, attraverso una pressione selettiva sulla popolazione batterica, l'emergere di determinati virotipi a scapito di altri, anche considerando che il vaccino bivalente, in particolare, pur contenendo varianti antigeniche di *E. coli* F18ac e F4ac, conferisce protezione crociata nei confronti di ETEC F18ab, F4ab e F4ad (Nadeu et al., 2017).

Ultimo, ma non per importanza, vale la pena sottolineare il ruolo che gli antimicrobici hanno nella selezione della popolazione batterica patogena e commensale. A questo proposito non si può escludere che le variazioni quali-quantitative nell'uso di molecole antimicrobiche a scopo terapeutico e metafilattico, osservate in questi ultimi anni, abbia potuto favorire e modulare il riemergere di determinati virotipi a scapito di altri.

Monitorare l'epidemiologia dei ceppi ETEC responsabili dei focolai di colibacilloso enterica in un allevamento o in un'area come potrebbe essere una regione ad alta densità suinicola è un importante strumento per un corretto approccio nella prevenzione e nella gestione della problematica sanitaria in allevamento.

La diagnosi di colibacilloso attraverso l'impiego di criteri quantitativi batteriologici e la successiva genotipizzazione per evidenziare i fattori di virulenza rivestono un ruolo diagnostico fondamentale. La conoscenza del virotipo responsabile di un focolaio di colibacilloso e l'eventuale variabilità dei ceppi isolati in corso di focolai, permettono una corretta analisi della problematica e forniscono informazioni per la scelta di misure di controllo e di prevenzione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bao W.B., Wu S.L., Musa H.H., Zhu G.Q., Chen G.H., (2008), "Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds.", *J Anim Breed Genet.*,125(6):427-430.
2. Casey T.A., Bosworth B.T., (2009), "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine.", *J Vet Diagn Investig.*, 21:25-30.
3. Fairbrother J.M., Gyles C.L. (2012) Colibacillosis in: Ziemmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. *Diseases of Swine*, 10 ed. UK: WileyBlackwell, 723-47.
4. Frydendahl K., (2002) "Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches", *Vet Microbiol.* 85(2):169-82.
5. Kelly D, Begbie R., King T.P.,(1994), *Nutr Res Rev* 7:233-257.
6. Luise D., Lauridsen C., Bosi P., Trevisi P., (2019), "Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs", *Journal Anim Sci Biotechnol*, 10:53.
7. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Rosamilia A., Biasi G., Maioli G., Dottori M., (2014), "Prevalence of F4 Hemolytic *E. coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea", "Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress" June 8 – 11, Cancun, Quintana Roo, Mexico,VOLUME II, 469.
8. Luppi A., Gibellini M.V., Gin T., Vangroenweghe F., Vandebroucke V., Bauerfeind R., Binilauri P., Labarque G. and Hidalgo A., (2016), "Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea

- in Europe”, *Porcine Health Management* 2:20. DOI 10.1186/s40813-016-0039-9.
9. Nadeau É., Fairbrother J.M., Zentek J., Bélanger L., Tremblay D., Tremblay C.-L., Röhe I., Vahjen W., Brunelle M., Hellmann K., Cvejic C., Brunner B., Schneider C., Bauer K., Wolf R., Hidalgo Á., (2017), “Efficacy of a single oral dose of a live bivalent *E. coli* vaccine against post-weaning diarrhea due to F4 and F18-positive enterotoxigenic *E. coli*” *The Veterinary Journal*, 226, 32–39.
  10. Osek J., (1999), “Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning”, *Vet Microbiol.*, 68:209–17.
  11. Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P., (2012), “Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains”, *Vet Microbiol.* 154:369–75

# **RISULTATI PRELIMINARI DELLO STUDIO DI VALUTAZIONE DEGLI EMOSIERI TESTICOLARI COME MATRICE PER LA RICERCA DI MICOPLASMI**

## **PRELIMINARY RESULTS OF A STUDY FOR THE EVALUATION OF PROCESSING FLUIDS AS SAMPLE FOR MICOPLASMAL DETECTION**

USTULIN M.<sup>1</sup>, ROSSI E.<sup>2</sup>, TARGHETTA C.<sup>1</sup>, CAPORAL A.<sup>1</sup>, VIO D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie,  
Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)

<sup>2</sup> Libera professionista, Montebelluna (TV)

**Parole chiave:** emosieri testicolari, micoplasmi

**Keywords:** processing fluids, Mycoplasma

### **RIASSUNTO**

Recenti dati bibliografici hanno evidenziato la possibilità di rilevare *M. hyopneumoniae* da emosieri testicolari. All'evidenza non comune della presenza di questo patogeno al di fuori dell'apparato respiratorio si aggiunge la potenziale possibilità di utilizzare questa tipologia di campione aggregato per lo studio delle dinamiche di infezione di *M. hyopneumoniae* e, in analogia con altre patologie del suino, per il monitoraggio aziendale.

Questo studio supporta la possibilità di evidenziare *M. hyopneumoniae* da emosieri testicolari e aggiunge la possibilità di riscontrare la presenza di *M. hyorhinis*; la rilevazione precoce del patogeno potrebbe portare interessanti informazioni epidemiologiche utili anche a chiarire le modalità di trasmissione nelle prime fasi di vita del suino.

### **ABSTRACT**

Recent publication suggest the possibility for *M. hyopneumoniae* to be found from processing fluids. This pathogen has been rarely found outside the respiratory tract and evidence of early transmission can induce to re-evaluate its epidemiology. Moreover, the possibility of using processing fluids, a group sample, for monitoring of *M. hyopneumoniae* can be of interest.

The present study support the possibility to evidence *M. hyopneumoniae* from processing fluids and include the observation of *M. hyorhinis* in this particular sample.

### **INTRODUZIONE**

*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) è un batterio particolarmente esigente e rappresenta l'agente eziologico primario della polmonite enzootica, patologia respiratoria cronica nel suino; in ragione della capacità di *M. hyopneumoniae* di aderire alle ciglia delle cellule epiteliali delle vie respiratorie, il batterio è in grado di ridurre la clearance polmonare, favorendo infezioni batteriche (Zilieski e Ross, 1992).

I danni causati da *M. hyopneumoniae* sono tenuti sotto controllo tramite la vaccinazione e, nei casi più critici, tramite terapia antimicrobica; in entrambe le situazioni, seppure si rilevi il contenimento e la riduzione delle lesioni polmonari e, indirettamente dei danni economici, non si previene la colonizzazione delle vie aeree e gli animali pertanto continuano ad albergare il patogeno nelle prime vie respiratorie ed in particolare nelle tonsille, permettendone la trasmissione per via respiratoria, attraverso aerosol contaminato da animale infetto ad animale sano con diffusione, anche rapida, all'interno del gruppo. La polmonite enzootica, inizia

generalmente a manifestarsi in animali in accrescimento; la rapidità di diffusione e la precocità dei sintomi dipendono dal numero di animali infetti e dalla precocità di infezione (Thacker, 2008). In caso di polmonite enzootica la *restitutio ad integrum* delle lesioni polmonari non è mai completa; le lesioni cicatriziali polmonari e le aderenze pleuriche possono permanere per tutta la vita dell'animale determinando il deprezzamento delle carcasse al macello.

Gli studi finora eseguiti hanno messo in evidenza lo spiccato tropismo di *M. hyopneumoniae* per le vie respiratorie del suino, tuttavia un recente report ha evidenziato la presenza di questo patogeno negli emosieri testicolari, ovvero i liquidi di percolamento dei testicoli dei suinetti e delle code raccolti durante le procedure di castrazione e di taglio della coda (Vilata et al., 2019). Questa evidenza, se confermata, suggerisce una potenziale affinità di questo micoplasma per l'apparato riproduttore, in analogia a quanto già noto per micoplasmi aviari e per *Mycoplasma bovis* (Nicholas et al., 2003), in ragione della quale potrebbero essere riconsiderate le vie di trasmissione e, di conseguenza, l'epidemiologia dell'infezione da *M. hyopneumoniae*.

## MATERIALI E METODI

Questo studio è stato svolto in un allevamento da riproduzione a ciclo aperto con parti settimanali in cui erano state precedentemente rilevate problematiche respiratorie riferibili a patologia da micoplasmi, confermate da indagini di laboratorio, in cui vengono allevate circa 550 scrofe.

Le scrofette, nate in azienda vengono vaccinate per *M. hyopneumoniae* a 7 giorni, a 30 giorni e 180 giorni e per PCV2 a 30. I suinetti sono sottoposti allo stesso programma vaccinale e vengono venduti a circa 80 giorni di vita.

Il programma vaccinale completo applicato in allevamento prevede per le scrofette la vaccinazione per *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Parvovirus e Leptospirosi a 170 e 190 giorni, per Influenza suina a 90 e 110 giorni, *Actinobacillus pleuropneumoniae* a 120 e 150 giorni, PRRS a 200, 220, 310 giorni di vita. Le primipare vengono vaccinate per E. coli a circa 60 giorni di gestazione. L'intero parco scrofe viene vaccinato per *Erysipelothrix rhusiopathiae*, Parvovirus e Leptospirosi e per Influenza suina ogni 6 mesi e per PRRS ogni 4 mesi.

Il protocollo di campionamento ha previsto la raccolta settimanale per 6 settimane consecutive degli emosieri testicolari nel periodo dicembre 2019 – gennaio 2020 suddividendo le nidiate dei riproduttori inclusi nello studio secondo l'ordine di parto. I campioni sono stati conferiti refrigerati entro 48 ore dal prelievo alla Sezione Territoriale di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Ciascun campione è stato analizzato per *M. hyopneumoniae* e *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) tramite multilex real time PCR. La procedura di prova prevede una fase di estrazione degli acidi nucleici utilizzando l'estrattore automatico King Fisher Flex (ThermoFisher scientific) e il kit MagMAX core Nucleic Acid Purification Kit (ThermoFisher Scientific). Il protocollo di PCR è un protocollo *in house* che utilizza come target 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).

## RISULTATI

Nel corso del monitoraggio di sei settimane sono stati raccolti 13 campioni di emosieri testicolari che hanno incluso le nidiate di 106 scrofe di diverso ordine di parto.

Le analisi hanno evidenziato una positività per *M. hyopneumoniae* in un gruppo di secondipare e una positività in un gruppo di pluripare. A questo si aggiunge una positività per *M. hyorhinis* da un gruppo di pluripare.

Il numero di animali campionati, l'ordine di parto del gruppo e i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 1.

|             | Numero nidiate | Ordine di parto | <i>M. hyopneumoniae</i> | <i>M. hyorhinis</i> |
|-------------|----------------|-----------------|-------------------------|---------------------|
| Settimana 1 | 7              | Secondo parto   | <b>Pos</b>              | Neg                 |
|             | 5              | Terzo parto     | Neg                     | Neg                 |
|             | 12             | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |
| Settimana 2 | 5              | Secondo parto   | Neg                     | Neg                 |
|             | 12             | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |
| Settimana 3 | 7              | Secondo parto   | Neg                     | Neg                 |
|             | 12             | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |
| Settimana 4 | 11             | Pluripare       | Neg                     | <b>Pos</b>          |
|             | 10             | Pluripare       | <b>Pos</b>              | Neg                 |
| Settimana 5 | 4              | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |
|             | 5              | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |
| Settimana 6 | 9              | Primo parto     | Neg                     | Neg                 |
|             | 7              | Pluripare       | Neg                     | Neg                 |

**Tab. 1** Risultati/results

## DISCUSSIONE

Nonostante il numero contenuto di campioni incluso in questa valutazione della presenza di Micoplasmi patogeni per il suino in emosieri testicolari, è stato possibile riscontrare campioni positivi non solo per *M. hyopneumoniae*, già recentemente segnalato in bibliografia, ma anche per *M. hyorhinis*. A nostra conoscenza non vi sono precedenti segnalazioni di questo Micoplasma in emosieri testicolari, per quanto un certo tropismo per l'apparato riproduttivo potesse essere suggerito dall'osservazione di positività per questo batterio dai secreti vaginali di scrofe (Ustulin et al., 2019).

Per quanto possa apparire anomala la presenza negli emosieri testicolari di *M. hyorhinis* e ancora di più di *M. hyopneumoniae*, considerato esclusivamente un patogeno dell'apparato respiratorio, un'indagine bibliografica suggerisce che il ritrovamento a livello di apparato riproduttore in altre specie animali e nell'uomo di Micoplasmi patogeni, non sia un fatto eccezionale: *M. bovis*, che nella specie bovina oltre a polmoniti e artriti può essere causa di mastiti e infertilità (Nicholas et al., 2003), *Mycoplasma gallisepticum*, che causa patologia respiratoria nel pollo, può essere trasmesso per via verticale (Raviv et al., 2013), *Mycoplasma pneumoniae*, generalmente considerato un patogeno respiratorio nell'uomo, è stato isolato dal tratto urogenitale (Goulet et al., 1995).

E' stato dimostrato che *M. hyopneumoniae* colonizzi i suinetti durante il periodo di lattazione, che la scrofa sia la principale fonte di infezione (Calsamiglia e Pijoan, 2000) e che la prevalenza di positività in PCR delle cavità nasali delle scrofe, inteso come numero di animali escretori del gruppo, sia un fattore di rischio (Pieters et al., 2014).

L'evidenziazione di Micoplasmi negli emosieri testicolari mette in luce la possibilità potenziale di utilizzare questa matrice come campione aggregato per la valutazione della circolazione di Micoplasmi in allevamento. L'analisi di campioni aggregati viene largamente utilizzata per il monitoraggio di patologie del suino in quanto permette di aumentare la sensibilità diagnostica a livello aziendale includendo un maggior numero di soggetti nel campione senza aumentare

eccessivamente il numero di campioni e, di conseguenza, i costi relativi alle analisi. Oltre agli emosieri testicolari, i fluidi orali rappresentano una dei campioni aggregati più largamente utilizzati ma si sono dimostrati scarsamente adatti al monitoraggio dei *M. hyopneumoniae* (Hernandez-Garcia et al., 2017).

## CONCLUSIONI

I risultati preliminari di questo studio, ottenuti tramite real time PCR, e per i quali è prevista la validazione anche tramite esame colturale, supportano la possibilità di rinvenire in emosieri testicolari *M. hyopneumoniae* recentemente suggerita da dati pubblicati in letteratura ed evidenziano che anche per *M. hyorhinis* possa esservi tale possibilità.

## BIBLIOGRAFIA

1. Calsamiglia M., Pijoan C. (2000) "Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sow. Vet Rec 146, 530-532.
2. 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.
3. Fano, E., Pijoan, C., Dee, S., Deen, J., 2007. "Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs" Canadian Journal of Veterinary Research, 71, 195–200
4. Goulet M, Dular R, Tully JG, et al. "Isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from the human urogenital tract." J Clin Microbiol 1995;33:2823–5
5. Hernandez-Garcia J, Robben N, Magnée D, Eley T, Dennis I, Kayes SM, Thomson JR, Tucker AW. "The use of oral fluids to monitor key pathogens in porcine respiratory disease complex." Porcine Health Manag. 2017 Apr 5;3:7. doi: 10.1186/s40813-017-0055-4. eCollection 2017.
6. Nicholas R.A., Aiyling R.D. "Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control". Res Vet Sci. 2003 Apr;74(2):105-12.
7. 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.
8. Raviv, Z. & Ley, D.H. (2013). "Mycoplasma gallisepticum infection." In D.E. Swayne, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez, & V.L. Nair (Eds.), Diseases of Poultry (pp. 877–893). Ames, IA: Wiley-Blackwell.
9. Pieters M., Cline G.S., Payne B.J., Prado C., Ertl J.R., rendhal A.K. (2014) "Intra-farm risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning age". Vet. Microbiol., 172 (2014), pp. 575-580
10. Thacker E. L. "Mycoplasmal Diseases" (2008) in Diseases of swine 9th edition, Blackwell Publishing (2006), 387-417.
11. Ustulin M., Catania S., Gobbo F., Fincato A., Targhetta C., Toson M., Vio D., (2019) "Studio sulla trasmissione di *Mycoplasma hyorhinis*". Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, XLV Meeting Annuale.
12. Vilata C., Sanhueza J.M., Murray D., Johnson L., Pieters M. (2019) "Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in piglets processing fluids. VetRec 26;185(16):510. doi:10.1136/vetrec-105475.
13. Zielinski GC, Ross RF. (1992). "Morphologic features and hydrophobicity of the cell surface of *Mycoplasma hyopneumoniae*." Am J Vet Res. 1992 Jul;53(7):1119-24.



# INDAGINE PRELIMINARE SULLA PRESENZA DI ANTICORPI ANTI VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) NEGLI EMOSIERI TESTICOLARI

## PILOT INVESTIGATION ON THE PRESENCE OF ANTI - HEPATITIS E VIRUS ANTIBODIES IN PIGLET PROCESSING FLUIDS

DI BARTOLO I.<sup>1</sup>, DE SABATO L.<sup>1</sup>, CHELLI E.<sup>1</sup>, ALBORALI G.L.<sup>2</sup>, TONNI M.<sup>2</sup>,  
MONINI M.<sup>1</sup>, DE LUCIA A.<sup>3</sup>, OSTANELLO F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> *Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica Veterinaria,  
Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161, Roma, Italy*

<sup>2</sup> *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna,  
Via Bianchi, 9, 25124, Brescia, Italy*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna,  
Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italy*

**Parole chiave:** virus dell'epatite E, sierologia, suini, sorveglianza, emosieri testicolari

**Keywords:** Hepatitis E virus, serology, swine, surveillance, processing fluids

### RIASSUNTO

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus a RNA che causa, nell'uomo, un'epatite acuta generalmente autolimitante. I suini (domestici e selvatici) sono il principale reservoir. L'identificazione delle aziende infette è il presupposto principale per implementare dei programmi di sorveglianza per questa zoonosi, ormai considerata emergente, e per ridurre il rischio di introdurre prodotti contaminati nella filiera di produzione degli alimenti. L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di valutare il possibile uso degli emosieri testicolari ottenibili al momento della castrazione dei suinetti (*processing fluids*, PF) per la ricerca di anticorpi anti-HEV. Cinquantacinque campioni individuali appaiati di siero e PF sono stati prelevati da altrettanti suinetti appartenenti a 20 diverse nidi e analizzati con un kit commerciale ELISA per la ricerca di anticorpi anti-HEV. Una correlazione positiva ( $\rho=0,677$ ;  $p<0,01$ ) è stata evidenziata tra il rapporto signal-to-cut-off (S/Co) degli anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF. In tutte le nidi era presente almeno 1 suinetto sieropositivo ma solo 13 (65%) sono risultate positive anche nei PF. Per valutare il possibile utilizzo di pool di PF e il limite di rilevabilità del test ELISA, sono stati creati pool artificiali miscelando emosieri individuali positivi con valore ELISA S/Co alto, medio, medio-basso e basso con a 3, 4, 5 e 6 campioni individuali negativi di PF. I risultati ottenuti suggeriscono che è ancora possibile identificare un pool positivo quando almeno un campione individuale di PF con medio (S/Co>2,5) o alto (S/Co>6) livello anticorpale è miscelato con 5 o 6 campioni individuali di PF negativi. Il rilevamento, nei PF, di anticorpi anti-HEV di origine materna indica una passata esposizione al virus delle scrofe. I PF potrebbero rappresentare uno strumento rapido, non-invasivo ed economico per identificare le aziende infette da HEV.

### ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus causing an acute generally self-limited disease in humans. Pigs and wild boars are the main reservoirs. Identifying HEV positive pig farms is important to implement surveillance programmes for this emerging zoonotic agent and



to limit the risk of introducing contaminated products into the food chain. The aim of this study was to evaluate the use of serosanguineous fluids obtained as part of castration practice (processing fluids, PF) to detect anti-HEV antibodies in newborn piglets. Fifty-five paired serum and PF samples were collected from piglets of 20 different litters and tested with a commercial ELISA kit. A positive correlation ( $\rho=0.677$ ;  $p<0.01$ ) was found between signal-to-cut-off (S/Co) ratio of anti-HEV antibodies in serum and PF samples. In all litters there was at least one positive piglet in serum. Thirteen litters (65%) were also positive in PF. To simulate the use of PF as pooled samples, the limit of detection of the ELISA was assessed mixing the PF sample with strong, medium, medium-weak and weak ELISA S/Co with 3, 4, 5 and 6 negative PF samples. Our results suggest that it is still possible to identify a positive PF pool when at least one individual PF with medium ( $S/Co>2.5$ ) or strong ( $S/Co>6$ ) antibody level is mixed with 5 or 6 individual negative PF samples. The detection of anti-HEV maternal-derived antibodies in PF confirms a past exposure of sows to the virus. PF may represent a rapid, non-invasive and economical tool to identify HEV positive farms.

## INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è causa di epatite negli animali e nell'uomo (Purcell e Emerson, 2008). HEV è un RNA virus a singolo filamento dotato di quasi-envelope classificato nella famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus* (Purdy *et al.*, 2017). Le specie del genere *Orthohepevirus* A comprendono 8 genotipi (da HEV-1 a HEV-8) in grado di infettare l'uomo ed altri mammiferi. Solo i ceppi appartenenti ai genotipi da HEV-1 a HEV-4 sono stati messi in evidenza in Europa. HEV-1 e HEV-2 infettano solo l'uomo mentre HEV-3 e HEV-4 sono zoonosici. In passato, in Europa, i casi umani causati da HEV-1 e HEV-2 erano messi in relazione con soggiorni in aree endemiche (Paesi in via di sviluppo). Tuttavia, negli ultimi 10 anni, è stato descritto un numero crescente di casi autoctoni, causati dalla trasmissione zoonosica dei genotipi HEV-3 e HEV-4 (Aspinall *et al.*, 2017), attualmente considerati endemici in alcuni Paesi industrializzati (Chalupa *et al.*, 2014). In Europa, la trasmissione alimentare di HEV-3 e HEV-4 sembra essere una delle principali modalità di infezione ed è correlata al consumo di prodotti a breve stagionatura (principalmente salsicce contenenti fegato di suino) e carne poco cotta di cinghiale (Kamar *et al.*, 2017).

La presenza di HEV-3, il genotipo più frequente in Europa, è stata largamente descritta nelle popolazioni di suini (Pavio *et al.*, 2017). La trasmissione all'uomo può quindi essere favorita dall'elevata prevalenza di aziende e capi infetti.

In Europa, la sieroprevalenza intra-aziendale per HEV varia dal 30% al 98% (Salines *et al.*, 2017), con alcune differenze relative ai singoli Paesi (Casas *et al.*, 2009, Lange *et al.*, 2017, Rose *et al.*, 2011). Anche la prevalenza di animali infetti è molto variabile: da un minimo del 10% fino a un massimo del 100% (Salines *et al.*, 2017).

Negli ultimi anni, sono stati implementati numerosi metodi per la ricerca sia dell'RNA di HEV sia di anticorpi specifici (IgG e IgM) (Kumar *et al.*, 2013, Ponterio *et al.*, 2014, Purcell e Emerson, 2008).

A causa delle implicazioni di sanità pubblica e della sua grande diffusione nelle popolazioni di suini, è importante determinare la prevalenza di allevamenti infetti. Sono quindi necessari programmi di sorveglianza per HEV allo scopo di acquisire maggiori conoscenze sulla presenza, prevalenza e caratteristiche dei ceppi circolanti negli allevamenti, al fine di implementare eventuali misure di controllo con lo scopo di ridurre il rischio di infezione nei suini e, di conseguenza, il rischio di trasmissione di HEV all'uomo (EFSA, 2017, Salines *et al.*, 2017).

La castrazione chirurgica dei suini è una pratica routinaria e, verosimilmente, lo sarà ancora nel prossimo futuro, almeno fino a quando non saranno disponibili efficaci sistemi alternativi. Se la scrofa è entrata in contatto con HEV nel corso della sua vita, è lecito ritenere che, come per altri patogeni, i suinetti ricevano, attraverso il colostro, anticorpi di origine materna (MDA) specifici per HEV che potrebbero essere rilevati nei fluidi sieromorragici (emosieri) originati dai testicoli asportati (*processing fluids*, PF).

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impegno dei PF come matrice biologica per rilevare MDA anti-HEV, allo scopo di identificare in maniera rapida ed economica gli allevamenti infetti.

## MATERIALI E METODI

### *Campioni*

Lo studio è stato condotto in un'azienda a ciclo chiuso del nord Italia con circa 2500 scrofe. L'azienda è positiva stabile nei confronti del virus della Sindrome riproduttiva e respiratoria (PRRSV) ed è dotata di elevate misure di biosicurezza. L'allevamento viene condotto in bande settimanali; di conseguenza, la castrazione dei suinetti viene effettuata con la stessa cadenza. Come stabilito dalla direttiva 2008/120/EC, le code non vengono tagliate. I PF esaminati sono stati quindi ricavati esclusivamente dai testicoli.

Il numero di nidiata da esaminare (20) è stato calcolato in modo da garantire il 95% di probabilità di evidenziare almeno una nidiata positiva quando la sieroprevalenza è  $\geq 5\%$ . Cinque delle 20 scrofe esaminate (tutte nate in azienda) erano primipare e 15 pluripare. Questa proporzione è rappresentativa della distribuzione per età delle scrofe aziendali.

Le nidiata, prima delle adozioni, sono state selezionate in maniera casuale durante le procedure di castrazione (effettuata a circa 3 giorni di vita). Da tre suinetti per ciascuna nidiata (selezionati in maniera casuale) sono stati raccolti un campione di sangue e i testicoli. I campioni di sangue sono stati prelevati utilizzando un ago sterile per ciascun suinetto. I testicoli sono stati raccolti individualmente e posti all'interno di un sacchetto di plastica. Dopo circa tre ore a temperatura ambiente, i testicoli sono stati rimossi e l'emosiero è stato prelevato asepticamente. Il siero è stato ottenuto dal sangue ed entrambi i campioni sono stati conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino all'esecuzione delle analisi.

### *Ricerca degli anticorpi anti-HEV*

Per la ricerca degli anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF è stato utilizzato un kit commerciale ELISA (HEV-Ab, Wantai Biopharmaceutical Inc., Beijing, China), seguendo le istruzioni del produttore. Il kit commerciale ELISA utilizzato in questo studio consente di mettere in evidenza gli anticorpi totali anti-HEV ed è validato per l'esame dei sieri e non dei PF. Come specificato dal produttore, il valore di cut-off è stato calcolato come media dei valori di densità ottica (OD) di tre sieri negativi di controllo  $+0,12$ . I sieri e i PF individuali con un valore di OD superiore al valore di cut-off sono stati considerati positivi per anticorpi anti-HEV. La nidiata è stata considerata positiva quando almeno uno dei suinetti esaminati è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero e/o nel PF. Il rapporto signal-to-cut-off (S/Co) è stato calcolato per ciascuno dei campioni esaminati secondo la seguente formula: valore di OD del campione/valore di cut-off.

Per simulare l'uso di pool di campioni di PF, il limite di rilevanza del test ELISA è stato valutato miscelando 10  $\mu\text{l}$  di PF, selezionati in maniera casuale, con alto, medio, medio-basso e basso valore S/Co (rispettivamente: 6,36; 2,53; 1,73 e 1,24) con un uguale volume di 3, 4, 5 e 6 campioni di PF negativi (S/Co  $< 0,03$ ) (diluizione da 1:4 a 1:7).

### *Analisi statistica*

I risultati (a livello individuale e di nidiata) sono stati statisticamente analizzati considerando come *gold standard* i risultati del test ELISA eseguito sul siero. La proporzione di suinetti e nidiata positive al test ELISA (nel siero o nel PF) in funzione del numero di parti della scrofa è stata confrontata utilizzando il test di Fisher. Gli intervalli di confidenza sono stati calcolati con il metodo binomiale di Clopper-Pearson, basato su una distribuzione  $\beta$ .

Per valutare la possibile correlazione tra i valori di S/Co dei sieri e dei PF, è stato calcolato il coefficiente di correlazione non parametrico *rho* di Spearman. La curva ROC (*receiver operating characteristic*) è stata utilizzata per definire il cut-off ottimale per l'interpretazione dei valori di S/Co ottenuti esaminando i PF. Sono stati inoltre calcolati i valori di sensibilità (Se) e di specificità (Sp) relativi.

La concordanza tra i risultati ottenuti dall'esame del siero e dei PF individuali, è stata calcolata (per ciascun animale e per ciascuna nidiata) utilizzando il coefficiente Kappa (*K*) di Cohen (Altman, 1991). La concordanza è stata calcolata utilizzando sia il valore di cut-off suggerito dal produttore sia quello calcolato.

La sensibilità dell'esame dei pool artificiali di PF (pSe) è stata calcolata come rapporto tra il numero di nidiata positive all'esame dei PF e quello delle nidiata positive nel siero.

Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il software SPSS, version 25 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA).

## **RISULTATI**

Campioni di siero e di PF sono stati prelevati da tre suinetti, selezionati casualmente, da ciascuna delle 20 nidiata. In 5 nidiata la quantità di siero o di PF raccolta da alcuni soggetti era insufficiente per le analisi; in queste nidiata il numero di suinetti analizzati è stato pari a 2. Nel complesso sono stati quindi esaminati 55 campioni appaiati di siero e PF. Cinquanta dei 55 campioni di siero (90,9%; 95%CI: 80,1-97,0) e 26 dei 55 campioni di PF (47,3%; 95%CI: 33,7-61,2) esaminati sono risultati positivi per anticorpi anti-HEV. Delle 55 coppie di campioni, 26 (47,3%; 95%CI: 33,7-61,2) sono risultate positive in entrambe le matrici biologiche (Tabella 1).

**Tabella 1.** Risultati, per ciascuna nidiata, della ricerca di anticorpi anti-HEV nei campioni di siero e di PF e numero di suinetti positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero e nei PF in ciascuna nidiata. Una nidiata è stata considerata positiva quando almeno 1 dei sieri e/o dei PF esaminati è risultato ELISA positivo alla ricerca di anticorpi di origine materna anti-HEV.

**Table 1.** Presence of anti-HEV ELISA-positive piglets in paired sera and processing fluid (PF) within litter and number of anti-HEV ELISA-positive piglets in sera or PF per litter. A litter was considered positive when at least one of the serum and/or PF collected from piglets resulted in ELISA-positive for MDA anti-HEV.

| Nidiata n.             | Nidiate positive alla ricerca di anticorpi anti-HEV (test ELISA)* |                                   | Suinetti positivi alla ricerca di anticorpi anti-HEV (n. positivi/esaminati) |                                   |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|                        | siero                                                             | PF                                | sera                                                                         | PF                                |
| 1                      | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 3/3                               |
| 2                      | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 2/3                               |
| 3                      | +                                                                 | +                                 | 2/2                                                                          | 2/2                               |
| 4                      | +                                                                 | -                                 | 2/3                                                                          | 0/3                               |
| 5                      | +                                                                 | -                                 | 2/3                                                                          | 0/3                               |
| 6                      | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 3/3                               |
| 7                      | +                                                                 | -                                 | 1/2                                                                          | 0/3                               |
| 8                      | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 1/3                               |
| 9                      | +                                                                 | +                                 | 2/2                                                                          | 3/3                               |
| 10                     | +                                                                 | -                                 | 1/2                                                                          | 0/2                               |
| 11                     | +                                                                 | +                                 | 2/3                                                                          | 2/3                               |
| 12                     | +                                                                 | -                                 | 3/3                                                                          | 0/3                               |
| 13                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 1/3                               |
| 14                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 2/3                               |
| 15                     | +                                                                 | -                                 | 2/2                                                                          | 0/2                               |
| 16                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 2/3                               |
| 17                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 3/3                               |
| 18                     | +                                                                 | -                                 | 3/3                                                                          | 0/3                               |
| 19                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 2/3                               |
| 20                     | +                                                                 | +                                 | 3/3                                                                          | 1/3                               |
| <b>totale positivi</b> | 20/20 (100%)<br>95%CI: 83,2-100                                   | 13/20 (65,0%)<br>95%CI: 40,8-84,6 | 50/55 (90,9%)<br>95%CI: 80,1-97,0                                            | 26/55 (47,3%)<br>95%CI: 33,7-61,2 |

\* In tutte le nidiate, almeno 1 suinetto è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero.

#### *Risultati del test ELISA a livello individuale e di nidiata*

Utilizzando il valore di cut-off indicato dal produttore del test ELISA, è stato evidenziato uno scarso livello di concordanza ( $K=0,17$ ; 95%CI: 0,03-0,30) tra i risultati ottenuti dall'esame dei campioni individuali di siero (50 positivi su 55) e di PF (26 positivi su 55). Utilizzando i risultati dell'esame dei sieri come *gold standard*, la Se relativa dell'esame dei PF è del 52% (95%CI: 37-66) e la Sp relativa del 100% (95%CI: 48-100) (Tabella 2). In tutte le 20 nidiate, almeno 1 dei suinetti esaminati è risultato positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero. In 13 di queste 20 nidiate, è stato rilevato almeno un campione individuale di PF positivo, con una sensibilità del pool (pSe) del 65% (95%CI: 41-85) (Tabella 3).

### Correlazione tra i risultati dell'esame dei campioni individuali di siero e di PF

La correlazione tra i valori di S/Co ottenuti dall'esame dei 55 campioni di siero e PF appaiati è riportato in Figura 1. È stata evidenziata una significativa correlazione positiva ( $\rho$  di Spearman: 0,677;  $p < 0,01$ ) tra i risultati ottenuti dall'esame delle due matrici.

**Tabella 2.** Concordanza tra i risultati dell'esame dei campioni di siero e PF, in funzione dei due valori di cut-off. Gli intervalli di confidenza al 95% sono riportati in parentesi.

**Table 2.** Agreement between processing fluids (PF) and sera-based HEV ELISA results at the individual level. Se: sensitivity; Sp: specificity. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

|                                                  |                                 |          | anticorpi anti-HEV nel<br>siero (%) |                      |                            |
|--------------------------------------------------|---------------------------------|----------|-------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Cut-off del<br>produttore                        | anticorpi<br>anti-HEV<br>nei PF | positivo | 26 (100)                            | 0 (0,0)              | 26                         |
|                                                  |                                 | negativo | 24 (82,8)                           | 5 (17,2)             | 29                         |
|                                                  |                                 | totale   | 50 (90,9)                           | 5 (9,1)              | 55                         |
|                                                  |                                 |          | Se: 52%<br>(37-66)                  | Sp: 100%<br>(48-100) | Kappa: 0,17<br>(0,03-0,30) |
|                                                  |                                 |          |                                     |                      |                            |
| Cut-off<br>calcolato<br>( $\geq 0,271$ S/<br>Co) | anticorpi<br>anti-HEV<br>nei PF | positivo | 36 (100)                            | 0 (0,0)              | 36                         |
|                                                  |                                 | negativo | 14 (73,7)                           | 5 (26,3)             | 19                         |
|                                                  |                                 | totale   | 50 (90,9)                           | 5 (9,1)              | 55                         |
|                                                  |                                 |          | Se: 72%<br>(58-84)                  | Sp: 100%<br>(48-100) | Kappa: 0,32<br>(0,09-0,54) |
|                                                  |                                 |          |                                     |                      |                            |

**Tabella 3.** Concordanza tra i risultati ottenuti, a livello di nidiata, dall'esame con il test ELISA dei PF e dei sieri. Una nidiata è stata considerata positiva quando almeno 1 suinetto aveva un valore di OD nel siero o nel PF superiore al valore di cut-off. Se: sensibilità; Sp: specificità. Gli intervalli di confidenza al 95% sono riportati in parentesi.

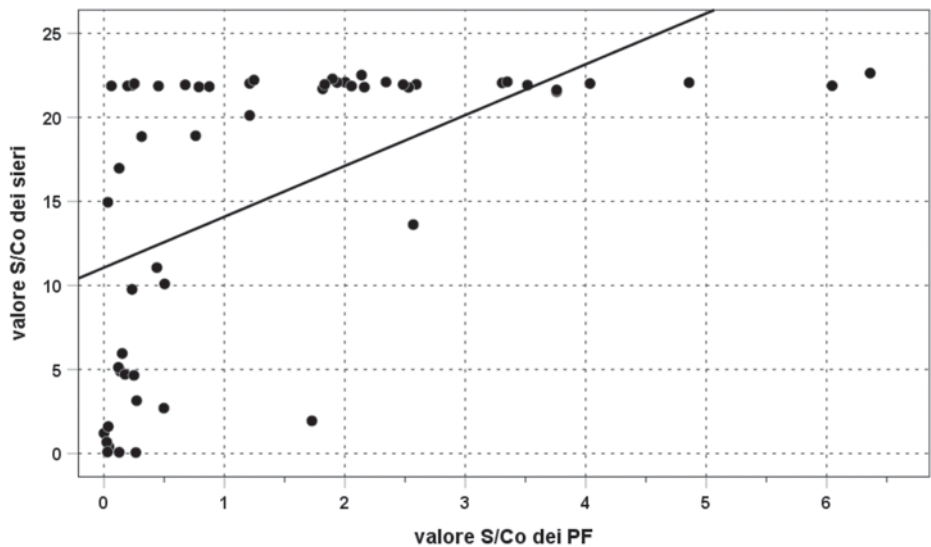
**Table 3.** Agreement between processing fluids (PF) and sera-based HEV ELISA results at the litter level. A litter was considered positive when at least one piglets had a serum or PF OD value > ELISA cut-off. Se: sensitivity; Sp: specificity. 95% confidence intervals are indicated in brackets.

|                                                                |          | Nidiata con almeno un suinetto<br>positivo all'esame del siero (%) |          |           |
|----------------------------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------------------|----------|-----------|
| Nidiata con almeno un<br>suinetto positivo all'esame<br>del PF | positivo | 13 (100.0)                                                         | 0 (0.0)  | 13        |
|                                                                | negativo | 7 (100.0)                                                          | 0 (0.0)  | 7         |
|                                                                | totale   | 20 (65.0)                                                          | 7 (35.0) | 20        |
|                                                                |          | Se: 65% (41-85)                                                    | Sp: nc   | Kappa: nc |

nc: non calcolabile

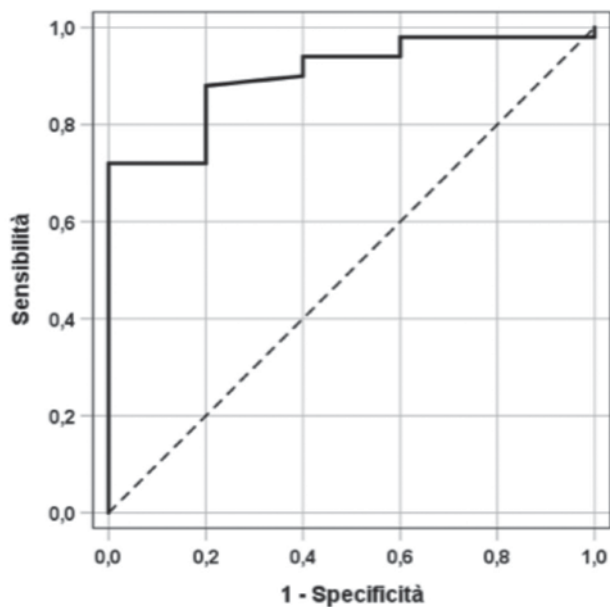
**Figura 1.** Correlazione tra i valori S/Co ottenuti dall’esame mediante test ELISA di 55 campioni appaiati di siero e PF.

**Figure 1.** Scatterplot of the signal-to-cutoff (S/Co) ratio values from individual serum and processing fluids ELISA results in 55 paired samples.



**Figura 2.** Curva ROC per l’interpretazione dei valori S/Co ottenuti dall’esame mediante test ELISA dei PF. Al valore soglia di  $S/Co \geq 0.271$  si ottiene il massimo valore di accuratezza.

**Figure 2.** Receiver operating characteristic (ROC) curve for interpreting S/Co ELISA results in processing fluids. 0.271 was the S/Co threshold value of the processing fluids showing the best accuracy.



**Tabella 4:** Risultati dell'esame di pool artificiali di PF ottenuti miscelando campioni individuali di PF positivi con valori di ELISA S/Co alto, medio, medio-basso e basso a un numero crescente (da 3 a 6) di campioni di PF negativi.

**Table 4:** *Effect of pooling one PF sample with high, medium, medium-low and low ELISA S/Co with 3 through 6 negative PF samples.*

| Valori ELISA S/Co<br>nei PF  | Diluizione | Numero dei pool positivi /totale pool esaminati           |                                             |
|------------------------------|------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
|                              |            | Valore di cut-off indicato<br>dal produttore <sup>a</sup> | Valore di cut-off<br>calcolato <sup>b</sup> |
| alto<br>(S/Co = 6.36)        | 1:4        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:5        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:6        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:7        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | totale     | 4/4                                                       | 4/4                                         |
| medio<br>(S/Co = 2.53)       | 1:4        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:5        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:6        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:7        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | totale     | 3/4                                                       | 4/4                                         |
| medio-basso<br>(S/Co = 1.73) | 1:4        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:5        | 1/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:6        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:7        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | totale     | 2/4                                                       | 4/4                                         |
| basso<br>(S/Co = 1.24)       | 1:4        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:5        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:6        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | 1:7        | 0/1                                                       | 1/1                                         |
|                              | totale     | 0/4                                                       | 4/4                                         |
| Totale                       | 1:4        | 3/4                                                       | 4/4                                         |
|                              | 1:5        | 3/4                                                       | 4/4                                         |
|                              | 1:6        | 2/4                                                       | 4/4                                         |
|                              | 1:7        | 1/4                                                       | 4/4                                         |
|                              | totale     | 9/16                                                      | 16/16                                       |

<sup>a</sup> (media del valore di OD dei sieri negativi di controllo)+0,12; <sup>b</sup> S/Co $\geq$ 0.271



### *Determinazione del valore ottimale di cut-off per l'interpretazione dei risultati dell'esame dei PF*

L'analisi della curva ROC indica che il livello migliore di accuratezza (Area sotto la curva, AUC: 90,2%) tra i risultati dell'esame con il test ELISA del siero e dei PF si ottiene al valore di S/Co dei PF  $\geq 0,271$  (Figura 2).

Utilizzando il valore soglia di S/Co  $\geq 0,271$ , la Se e Sp relativa dell'esame dei campioni di PF è pari, rispettivamente, al 72% (95%CI: 58-84) e 100% (95%CI: 48-100), rispetto ai risultati dell'esame dei campioni individuali di siero. L'accordo tra i risultati dell'esame dei PF e del siero è risultato modesto ( $K=0,32$ , 95%CI: 0,09-0,54) (Tabella 2).

Nessuna differenza statisticamente significativa (chi-quadrato di Fisher =0,07,  $p=1$ ) è stata evidenziata nella prevalenza di nidiate positive in funzione dell'età delle scrofe (primipare: 3 nidiate positive su 5; pluripare: 10 su 15).

Analogamente, nessuna differenza significativa è stata evidenziata nella prevalenza di sieri o PF positivi in funzione dell'età della scrofa (rispettivamente, chi-quadrato di Fisher =0,63,  $p=0,59$  e chi-quadrato di Fisher=0,06,  $p=1$ ).

### *Limite di rilevabilità del test ELISA nell'esame dei pool artificiali di PF*

Utilizzando il valore di cut-off suggerito dal produttore del kit ELISA, è stato possibile ottenere un risultato positivo quando un singolo campione individuale di PF (con un valore S/Co alto, medio o medio-basso) è stato miscelato ad almeno altri 4 campioni di PF individuali negativi. I pool artificiali hanno invece fornito tutti esito negativo quando un campione individuale di PF con valore S/Co basso è stato miscelato con 3, 4, 5 o 6 campioni di PF negativi (Tabella 4).

Utilizzando per l'interpretazione dei risultati il valore di cut-off calcolato (S/Co  $\geq 0,271$ ), tutti i pool artificiali sono risultati positivi (indipendentemente dal numero di PF negativi utilizzati per il loro allestimento) (Tabella 4).

## **DISCUSSIONE**

L'identificazione delle aziende infette da HEV è il presupposto principale per implementare misure efficaci di profilassi nei confronti di questo agente emergente di zoonosi, riducendo così il rischio che prodotti contaminati vengano introdotti nella filiera di produzione della carne suina. La trasmissione di HEV tra i suini è fortemente influenzata dal livello di contaminazione fecale dell'ambiente, il che suggerisce la possibilità di ridurre la prevalenza di animali infetti mediante una corretta gestione dell'azienda, l'applicazione di adeguate misure igieniche (compresa un'efficace pulizia e disinfezione dell'ambiente e delle attrezzature tra i diversi lotti di produzione) e misure di biosicurezza (EFSA, 2017).

L'eliminazione fecale di HEV è limitata nel tempo e fortemente dipendente dall'età dell'animale; ciò influisce sulla possibilità di utilizzare la ricerca dell'RNA virale per valutare la condizione di infezione delle aziende. La ricerca di anticorpi specifici per HEV nei sieri supera i limiti descritti; tuttavia, lo screening sierologico è proibitivo in termini di costi e stressante per gli animali.

Alcune pratiche routinariamente eseguite negli allevamenti suini (es. castrazione) facilitano la raccolta di campioni che possono essere utilizzati per monitorare lo stato delle infezioni (Vilalta *et al.*, 2018). Gli emosieri testicolari (PF) possono essere utilizzati, ad esempio, per monitorare la circolazione di PRRSV (Lopez *et al.*, 2018) o per rilevare la presenza di anticorpi di origine materna nei confronti di altri patogeni nei suinetti neonati. L'esame sierologico dei PF ha numerosi vantaggi rispetto all'esame del siero: la raccolta dei PF non è invasiva e riduce il disagio, lo stress, il dolore e le lesioni all'animale. Inoltre la raccolta dei

campioni di PF è rapida, economica, facile da realizzare e può essere eseguita da personale non veterinario.

Il presente studio ha avuto lo scopo di valutare l'uso dei PF come matrice biologica alternativa al sangue da utilizzare nello screening della presenza di anticorpi anti-HEV nelle aziende con riproduttori. Campioni appaiati di PF e siero di suinetti neonati sono stati analizzati, utilizzando un kit ELISA commerciale per determinare la presenza di anticorpi totali anti-HEV. La presenza di anticorpi anti-HEV è stata rilevata nei PF e una correlazione positiva è stata evidenziata ( $\rho=0,677$ ;  $p<0,01$ ) tra la quantità di anticorpi anti-HEV nei campioni individuali di siero e di PF.

A livello individuale, utilizzando il valore di cut-off indicato dal produttore per confrontare la proporzione di campioni di siero e PF positivi, è stata rilevata una scarsa concordanza ( $K=0,17$ ) tra i risultati ottenuti dall'esame delle due matrici biologiche e una bassa sensibilità relativa (52%) dei risultati dell'esame dei PF. Questo risultato è in linea con quanto riportato da altri studi che hanno evidenziato come la concentrazione di anticorpi nei fluidi biologici (es. *oral fluid* o *meat juice*) sia inferiore rispetto a quella del siero (Nielsen *et al.*, 1998, Olsen *et al.*, 2013). Pertanto, è probabile che anche nei PF la concentrazione di anticorpi anti-HEV sia inferiore rispetto a quella presente nel siero. Come già osservato per il *meat juice* (Nielsen *et al.*, 1998), i PF sono una miscela di siero, linfa e liquidi intracellulari e possono essere considerati una diluizione fisiologica del siero. Pertanto, gli animali che presentano una bassa concentrazione di anticorpi sierici e che forniscono un valore di OD in ELISA appena sopra il valore soglia, possono risultare negativi all'esame dei PF.

Per adattare all'esame dei PF il test ELISA, originariamente messo a punto per la ricerca di anticorpi anti-HEV nel siero, un nuovo valore di cut-off è stato calcolato utilizzando l'analisi della curva ROC.

Utilizzando il valore di cut-off calcolato, i risultati dell'esame con il test ELISA dei campioni individuali di PF hanno un valore di Se e Sp pari al 72% e 100%, rispettivamente, quando comparati con i risultati dell'esame dei sieri individuali. Nonostante ciò, la concordanza tra risultati dell'esame dei PF e quello dei sieri è risultata modesta ( $K=0,32$ ).

Nei suinetti, la quantità di anticorpi assunti con il colostro dipende da numerosi fattori quali, ad esempio, la quantità di colostro disponibile e la quantità di colostro ingerita, la concentrazione di anticorpi nel siero della scrofa e la quantità di quelli assorbiti a livello intestinale, l'ordine di parto e il peso del suinetto (Jenvey *et al.*, 2015, Kielland *et al.*, 2015). Tutti questi fattori, in particolare quelli individuali (ordine di parto e peso alla nascita) devono essere presi in considerazione per aumentare la probabilità di esaminare PF di suinetti con alti livelli anticorpali.

Nessuna differenza significativa ( $p>0,05$ ) nella prevalenza di nidiate positive è stata osservata tra scrofe giovani e anziane, suggerendo che l'età dei riproduttori non abbia nessuna influenza sulla probabilità di rilevare nidiate con almeno 1 soggetto positivo alla ricerca di anticorpi anti-HEV nei PF.

L'uso di pool di campioni permette di esaminare un maggior numero di animali, riducendo i tempi e i costi di diagnosi. Tuttavia, uno dei limiti principali derivanti dall'impiego dei pool è la possibilità che l'eccessiva diluizione dei campioni individuali positivi, porti la concentrazione dell'analita al di sotto della soglia di rilevanza del test, con un conseguente risultato falsamente negativo (De Regge e Cay, 2016, Maherchandani *et al.*, 2004). Per tale motivo, nel presente studio è stato valutato anche l'effetto della diluizione derivante dall'esame di campioni individuali positivi (ad alto, medio, medio-basso e basso titolo anticorpale) miscelati con quantità crescenti di campioni negativi.

I risultati ottenuti indicano che il test ELISA fornisce un risultato positivo quando un PF individuale con una quantità media ( $S/Co>2,5$ ) o alta ( $S/Co>6$ ) di anticorpi anti-HEV è

miscelato con 5 o 6 campioni individuali di PF negativi, rispettivamente. Tuttavia, questo risultato dipende in gran parte dal valore di cut-off utilizzato.

Quando è stato utilizzato il valore di cut-off calcolato attraverso la valutazione della curva ROC, il numero dei pool di PF falsamente negativi diminuisce in quanto vengono identificati come positivi anche i pool artificiali con le diluizioni più elevate di PF positivi. È interessante notare che utilizzando un campione di PF con alto valori di S/Co per creare il pool artificiale, questo risulta positivo fino alla massima diluizione (1:7). Pertanto, supponendo che la quantità di anticorpi materni (MDA) sia anche correlata al livello immunitario della scrofa (Jenvey *et al.*, 2015), con una dimensione media della nidiata di 14 e un rapporto tra sessi di 1:1, la presenza di un singolo suinetto maschio con un alto valore S/Co è sufficiente per identificare la nidiata come positiva.

Utilizzando il valore calcolato di sensibilità dei pool di PF (65%, 13 nidiati positive delle 20 esaminate, tab. 1), il numero di pool necessario per evidenziare la presenza di scrofe sieropositive per HEV in azienda è estremamente basso. Per esempio, se il pool è costituito da 3 emosieri individuali, l'esame di un minimo di 9 pool è sufficiente per avere il 99% di probabilità di un esito positivo quando la sieroprevalenza è  $\geq$  al 30% (Christensen e Gardner, 2000).

I risultati ottenuti indicano che l'esame dei PF può essere utilizzato per rilevare la presenza di infezione da HEV nelle aziende con riproduttori. La ricerca di anticorpi nei PF può rappresentare quindi un metodo rapido, economico e affidabile per valutare la presenza di HEV in questa tipologia di allevamenti, senza causare stress e lesioni agli animali (Vilalta *et al.*, 2018).

È ampiamente riconosciuto che il rischio della presenza di HEV nel fegato degli animali macellati è correlato a due fattori: a) eventuali co-infezione con patogeni ad attività immunodeprimente, in particolare PRRSV e, b) breve periodo di tempo tra l'infezione da HEV e la macellazione. I patogeni intercorrenti possono causare un aumento della durata del periodo di eliminazione fecale di HEV e la cronicizzazione dell'infezione (Salines *et al.*, 2019) mentre alti livelli di immunizzazione passiva possono posticipare l'infezione da HEV di circa 6 settimane (Andraud *et al.*, 2014).

L'esame dei PF può quindi rappresentare un valido strumento per monitorare HEV e PRRSV nelle sale parto, almeno per quanto riguarda la componente maschile delle nidiati. È importante tenere però in considerazione il fatto che l'esame sierologico dei PF fornisce informazioni relative alla sola condizione immunitaria della scrofa e non del suinetto. Di conseguenza, i campioni di PF possono essere utilizzati allo scopo di evidenziare l'infezione da HEV solo negli allevamenti con riproduttori. Tuttavia, l'esame sierologico dei PF consente di ottenere informazioni relative allo stato sanitario dell'allevamento, utile per pianificare eventuali misure di profilassi e controllo. La successiva valutazione della dinamica di infezione e la sorveglianza dell'esposizione degli animali al virus richiede ulteriori indagini diagnostiche condotte su suini età più avanzata.

Ulteriori studi sono necessari per valutare l'efficacia dell'esame sierologico dei PF come metodo di screening per stimare l'eventuale circolazione di HEV all'interno degli allevamenti. Inoltre, il presente studio è stato condotto in un unico allevamento e non tiene quindi in considerazione eventuali differenze correlate con la tipologia aziendale.

## BIBLIOGRAFIA

1. Altman D. G., (1991): Practical statistics for medical research, p. 611. Chapman and Hall, London.
2. Andraud M., Casas M., Pavio N., Rose, N. (2014). Early-life hepatitis e infection in pigs: the importance of maternally-derived antibodies. PloS one, 9, e105527.

3. Aspinall E.J., Couturier E., Faber M., Said B., Ijaz S., Tavošchi L., Takkinen J., Adlhoch C., on behalf of the country experts (2017). Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro surveillance*, 22(26):pii=30561.
4. Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martin, M. (2009). Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Veterinary microbiology*, 135, 248-252.
5. Chalupa P., Vasickova P., Pavlik I., Holub M. (2014). Endemic hepatitis E in the Czech Republic. *Clinical infectious diseases*, 58, 509-516.
6. Christensen J., Gardner, I. A. (2000). Herd-level interpretation of test results for epidemiologic studies of animal diseases. *Preventive veterinary medicine*, 45, 83-106.
7. De Regge N., Cay B. (2016). Comparison of PRRSV Nucleic Acid and Antibody Detection in Pen-Based Oral Fluid and Individual Serum Samples in Three Different Age Categories of Post-Weaning Pigs from Endemically Infected Farms. *PloS one*, 11, e0166300.
8. EFSA Panel on Biological Hazards: Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies R., Fernandez-Escamez P.S., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Di Bartolo I., John R., Pavio N., Rutjes S., van der Poel W., Vasickova P., Hempen M., Messens W., Rizzi V., Latronico F., Girones R. (2017). Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15, 4886, 89 pp.
9. European Union (2009). Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs (Codified version). *Official J Europ Union* L47:5–13.
10. Jenvey C.J., Reichel M.P., Cockcroft P.D. (2015). *Erysipelothrix rhusiopathiae* and *Mycoplasma hyopneumoniae*: the sensitivities of enzyme-linked immunosorbent assays for detecting vaccinated sows of unknown disease status using serum and colostrum, and the correlation of the results for sow serum, colostrum, and piglet serum. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 27, 211-216.
11. Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., Dalton H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17086.
12. Kielland C., Rootwelt V., Reksen O., Framstad T. (2015). The association between immunoglobulin G in sow colostrum and piglet plasma. *Journal of animal science*, 93, 4453-4462.
13. Kumar S., Subhadra S., Singh B., Panda B.K. (2013). Hepatitis E virus: the current scenario. *International journal of infectious diseases*, 17, e228-233.
14. Lange H., Overbo J., Borgen K., Dudman S., Hoddevik G., Urdahl A.M., Vold L., Sjurseth S.K. (2017). Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiology and infection*, 145, 181-186.
15. Lopez W.A., Angulo J., Zimmerman J.J., Linhares D.C. (2018). Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids. *Journal of Swine Health and Production*, 26, 146-150.
16. Maherchandani S., Munoz-Zanzi C.A., Patnayak D.P., Malik Y.S., Goyal S.M. (2004). The effect of pooling sera on the detection of avian pneumovirus antibodies using an enzyme-linked immunosorbent assay test. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 16, 497-502.
17. Nielsen B., Ekeröth L., Bager F., Lind P. (1998). Use of muscle fluid as a source

- of antibodies for serologic detection of Salmonella infection in slaughter pig herds. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 10, 158-163.
18. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., Panyasing Y., Zimmerman J. (2013). Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *Veterinary journal*, 198, 158-163.
  19. Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., Johne R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary research*, 48, 78.
  20. Ponterio E., Di Bartolo I., Orru G., Liciardi M., Ostanello F., Ruggeri F.M. (2014). Detection of serum antibodies to hepatitis E virus in domestic pigs in Italy using a recombinant swine HEV capsid protein. *BMC veterinary research*, 10, 133.
  21. Purcell R.H., Emerson S.U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology*, 48, 494-503.
  22. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., Smith D.B., ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *The Journal of general virology*, 98, 2645-2646.
  23. Rose N., Lunazzi A., Dorenlor V., Merbah T., Eono F., Eloit M., Madec F., Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 34, 419-427.
  24. Salines M., Andraud M., Rose N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary research*, 48, 31.
  25. Salines M., Dumarest M., Andraud M., Mahe S., Barnaud E., Cineux M., Eveno E., Eono F., Dorenlor V., Grasland B., Bourry O., Pavio N., Rose N. (2019). Natural viral co-infections in pig herds affect hepatitis E virus (HEV) infection dynamics and increase the risk of contaminated livers at slaughter. *Transboundary and emerging diseases*, 66, 1930-1945.
  26. Vilalta C., Sanhueza J., Alvarez J., Murray D., Torremorell M., Corzo C., Morrison R. (2018). Use of processing fluids and serum samples to characterize porcine reproductive and respiratory syndrome virus dynamics in 3 day-old pigs. *Veterinary microbiology*, 225, 149-156.



# CONFRONTO TRA L'UTILIZZO DI EMOSIERI TESTICOLARI E DI SANGUE NEL MONITORAGGIO DELLA PRRSV IN ALLEVAMENTI DA RIPRODUZIONE

## COMPARISON BETWEEN PROCESSING FLUIDS AND BLOOD SAMPLES FOR PRRSV MONITORING IN BREEDING HERDS

TONNI M.<sup>1</sup>, BONIOTTI M.B.<sup>1</sup>, OSTANELLO F.<sup>2</sup>, LEOTTI G.<sup>3</sup>, BIANCHI M.<sup>3</sup>,  
ANDREONI S.,<sup>3</sup> ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna

<sup>3</sup> Boehringer Ingelheim AH Italia - Milano.

**Parole chiave:** PRRSV, emosieri testicolari

**Key words:** PRRSV, processing fluids

### RIASSUNTO

L'utilizzo degli emosieri testicolari (EST) per il monitoraggio della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) in allevamenti da riproduzione è sempre più diffuso. Lo scopo di questo studio era quello di operare un confronto tra il monitoraggio longitudinale della PRRSV basato su campioni di sangue e di EST. Tutti i campioni sono stati raccolti in 10 allevamenti con un campionamento ogni 3 settimane, durante 5 mesi di studio. Gli EST sono stati raccolti con procedure standardizzate in pool di 10-15 nidiati con una dimensione omogenea del campione. Per ogni banda, sono stati poi raccolti 30 campioni di sangue prima dello svezzamento. Tutti i campioni sono stati sottoposti a PCR real-time per la ricerca del PRRSV. La presenza di almeno un campione positivo era sufficiente per identificare lo status di positività. È stato confrontato lo status di ogni banda in base ai risultati ottenuti dalle due matrici biologiche analizzate. Quarantacinque delle 64 bande, analizzate hanno mostrato lo stesso status. Al contrario, 19 bande erano discordanti. Ulteriori dati forniti dalle tre aziende con una routine settimanale hanno confermato lo status identificato dagli EST. Un'analisi più approfondita di questi risultati rivela la veridicità di entrambi i test, gli EST evidenziano la situazione dei suinetti a 3-4 giorni di vita, i campioni di sangue rappresentano la situazione in pre-svezzamento, con un possibile cambiamento della viremia. Pertanto, gli EST rappresentano una popolazione più ampia, ma solo al momento della castrazione, mentre i campioni di sangue vengono raccolti da pochi suini, con la possibilità però di scandire temporalmente i prelievi. Una integrazione di questi dati potrebbe migliorare ulteriormente la comprensione della circolazione virale all'interno di un allevamento. Concludendo, gli EST sono un materiale utile per monitorare la circolazione di PRRSV e consentono una descrizione più accurata dell'epidemiologia del virus all'interno di un allevamento. Come già suggerito da altri lavori, un possibile scenario futuro potrebbe essere quello di elaborare dei sistemi di monitoraggio della PRRS con un uso integrato degli EST e dei campioni di sangue.

### ABSTRACT

Use of processing fluids (PF) for PRRS virus monitoring in breeding herds is recently increased. Aim of this study was to asses a comparison between the PRRSV longitudinal monitoring based on blood samples and PF. The samples were collected in 10 farms with a 3-week routine during 5 months of study. PF were collect each batch with standard procedures in a pool of 10-15 litters to have a uniform size of the samples. From the same batch, 30 blood samples were collected,



before weaning. All the samples were submitted to PCR real time for PRRSV test. The presence of at least one positive sample per batch were sufficient to identify a positive status. Batches status based on the results from the two analysed materials were compared. Forty-five out of 64 batches showed the same PRRSV status. Conversely, 19 batches were discordant. Further data from three of the farms with a 1-week BMS (batch management system) confirmed the status and added more details at the PF monitoring dataset. A deeper analysis of these results disclose the truthfulness of both tests, PF express the status of 3-4 days old pigs, blood samples shows the batch status at pre-weaning age, with a relevant effect on viremia dynamic. Therefore, PF represent a wider population but only in one time point, while blood samples are collected from few pigs but even at different time points. An integrated interpretation of these data could lead a more deeply comprehension of the virus epidemiology within a herd. Finally, PF are a useful material for PRRS virus diagnosis and allow a more accurate description of the viremia dynamics within a farm. As already suggested by other studies, a possible future scenario could be the elaboration of PRRSV monitoring system with an integrate use of PF and blood samples.

## **INTRODUZIONE**

L'impatto economico della sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) sugli allevamenti italiani è molto rilevante ed il controllo del virus responsabile della patologia (PRRSV) continua ad essere uno stimolante campo di ricerca. Com'è noto la malattia ha forme cliniche diverse a seconda dell'età dei soggetti colpiti. Inoltre, la gravità della sintomatologia è influenzata da diversi fattori quali lo stato immunitario e la genetica dei suini, le condizioni ambientali, le infezioni secondarie e dal tipo di isolato virale (Jeffrey et al., 2012).

Le strategie di controllo della malattia si basano su un solido sistema di biosicurezza, sull'immunizzazione dei riproduttori e dei suinetti e sul controllo del flusso di animali. È quindi fondamentale conoscere il modello di circolazione virale all'interno dell'allevamento per poterlo classificare a seconda del livello di rischio. Tra i vari sistemi utilizzati, quello maggiormente condiviso è sicuramente quello proposto da Holtkamp e colleghi (Holtkamp et al., 2011). Tale metodo si basa sul livello di esposizione e di circolazione virale all'interno dell'allevamento, ponendo come punto focale la produzione di suini svezzati PRRSV-free.

Con questo obiettivo, la scelta del campionamento da effettuare sui suinetti in pre-svezzamento è un aspetto decisivo. Ad oggi il metodo più diffuso è quello del controllo periodico mediante PCR su siero ematico di un campione di 30 suinetti, target idoneo per rilevare almeno un positivo, assumendo almeno il 10% di prevalenza con un livello di confidenza del 95%, indipendentemente dalla dimensione della popolazione (Linhares et al., 2014). Ciononostante, alcuni studi hanno dimostrato che utilizzando questo approccio, esiste la possibilità di non rilevare alcuna positività anche in allevamenti endemicamente infetti (Linhares, 2013). È quindi sorta la necessità di affinare il metodo di campionamento e gli emosieri testicolari (EST) si stanno dimostrando una valida alternativa come materiale da sottoporre all'analisi biomolecolare. È stata rilevata un'alta concordanza tra i risultati delle PCR real-time ottenuti dall'analisi degli EST e quelli ottenuti dal siero ematico prelevati contestualmente (Lopez et al., 2018; Tonni et al., 2019). Inoltre è stata provata la validità come test di controllo in aziende infette che adottavano protocolli atti al raggiungimento dello status di "stabile" (Trevisan et al., 2019).

Lo scopo del presente lavoro è quello di confrontare l'utilizzo degli EST ed il siero ematico come materiale diagnostico per il monitoraggio della PRRS.

## **MATERIALI E METODI**

### **Disegno sperimentale**

In questo studio sono stati monitorati per la presenza di PRRSV 10 allevamenti da

riproduzione del Nord Italia per un periodo di circa 5 mesi. Sette allevamenti operavano secondo una routine tri-settimanale, tre allevamenti invece seguivano una scansione del lavoro settimanale. Nei primi sette allevamenti sono stati raccolti gli EST di tutte le nidiare raggruppandoli in pool di 10-15 nidiare (Tabella 1) e successivamente dalle stesse nidiare in fase di pre-svezzamento sono stati scelti 30 animali per il prelievo ematico.

I restanti tre allevamenti sono stati considerati come se lavorassero tri-settimanalmente, raccogliendo ogni tre settimane gli EST di tutte le nidiare, in pool di 10-15 nidiare. I medesimi animali sono stati poi campionati selezionando 30 soggetti in pre-svezzamento per il prelievo ematico. Dagli stessi tre allevamenti sono stati raccolti con uguali criteri anche gli EST delle nidiare relative alle due settimane che trascorrevano tra gli altri prelievi, senza però avere il prelievo di sangue in pre-svezzamento (Tabella 2).

**Tabella 1.** Numero di pool di EST raccolti per ogni azienda con bande tri-settimanali, lungo i 5 mesi di studio che sono valsi 6-7 bande campionate per azienda.

**Table 1.** Number of PF (processing fluids) collected per 3-weeks BMS (batch management system) farm during 5 months of study with 6-7 batches sampled each farm.

|           | N° scrofe<br>presenti | Numero di pool di EST analizzati |    |    |    |    |    |    |
|-----------|-----------------------|----------------------------------|----|----|----|----|----|----|
|           |                       | T1                               | T2 | T3 | T4 | T5 | T6 | T7 |
| Azienda 1 | 210                   | 2                                | 3  | 3  | 3  | 3  | 3  | 2  |
| Azienda 2 | 650                   | 4                                | 3  | 2  | 1  | 1  | 1  |    |
| Azienda 3 | 814                   | 2                                | 1  | 3  | 2  | 2  | 3  |    |
| Azienda 4 | 856                   | 9                                | 12 | 10 | 10 | 11 | 10 |    |
| Azienda 5 | 600                   | 4                                | 6  | 5  | 4  | 7  | 3  | 7  |
| Azienda 6 | 500                   | 1                                | 3  | 1  | 3  | 3  | 3  |    |
| Azienda 7 | 251                   | 4                                | 4  | 1  | 4  | 4  | 4  |    |

**Tabella 2.** Numero di pool di EST raccolti per ogni azienda con bande settimanali. Tra parentesi sono riportati i campioni di EST a cui non ha fatto seguito il prelievo di sangue in pre-svezzamento.

**Table 2.** Number of PF (processing fluids) collected per 1-weeks BMS (batch management system). In brackets, there are the PF of animals with no blood sampling in pre-weaning age.

| N° scrofe<br>presenti |      | Numero di pool di EST analizzati |     |    |      |    |     |    |     |    |     |    |     |    |
|-----------------------|------|----------------------------------|-----|----|------|----|-----|----|-----|----|-----|----|-----|----|
|                       |      | T1                               |     | T2 |      | T3 |     | T4 |     | T5 |     | T6 |     | T7 |
| Azienda 8             | 828  | 2                                | (9) | 2  | (9)  | 2  | (9) | 3  | (7) | 4  | (9) | 2  | (8) | 2  |
| Azienda 9             | 1055 | 2                                | (9) | 3  | (11) | 2  | (8) | 3  | (8) | 3  | (4) | 3  | (9) | 2  |
| Azienda 10            | 696  | 3                                | (8) | 3  | (6)  | 1  | (9) | 3  | (8) | 3  | (9) | 3  |     |    |

### Prelievo dei campioni e indagini di laboratorio

La raccolta del materiale derivante dalla castrazione chirurgica dei suinetti facenti parte di 10-15 bande è stata eseguita in modo tale da avere una ripartizione quantitativamente

omogenea tra i campioni durante ogni campionamento. La procedura seguiva quanto riportato da Vilalta e colleghi (2018) e dal materiale raccolto è stato prelevato una quantità di EST pari a 1,5 ml ed aliquotato in provette Eppendorf®. Tutti i campioni sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione ( $5\pm 3$  °C) prima della analisi biomolecolare, eccezion fatta per gli EST le cui bande non prevedevano il prelievo ematico (aziende 8,9,10) che sono stati congelati a  $-20\pm 3$  °C. I 30 soggetti per ogni banda da sottoporre a prelievo ematico sono invece stati scelti con un campionamento di convenienza scegliendo i suinetti maschi più deboli e meno reattivi (Lopez et al., 2018) con il preciso scopo di massimizzare la probabilità di individuare eventuali capi viremici. Anche il sangue è stato mantenuto a temperatura di refrigerazione ( $5\pm 3$  °C) fino al momento della analisi, in questo caso eseguita in pool di 5 campioni come suggerito dalla letteratura (Lopez et al., 2018), procedura che garantisce pressoché la stessa sensibilità del test eseguito in singolo.

Gli EST ed il siero ematico (ottenuto dalla centrifugazione a 3000 rpm per 3' del sangue prelevato) hanno seguito successivamente le stesse procedure di laboratorio. L'estrazione dell'RNA è avvenuta mediante l'utilizzo del kit MagMax Core Nucleic Acid Purification (Applied Biosystem, Foster City, California) tramite estrazione automatica con Biosprint 96 instrument (Qiagen, Hilden, Germany), attenendosi alle istruzioni del produttore.

Su tutti i campioni la ricerca del virus della PRRS è stata eseguita grazie ad una RT-PCR Real-Time seguendo le istruzioni del kit Virotype PRRSV RT-PCR (Indical Bioscience, Leipzig, Germany). Il limite soglia per considerare una campione positivo è stato fissato ad un valore di Ct (cycle threshold)  $\leq 37$ .

### **Analisi statistica**

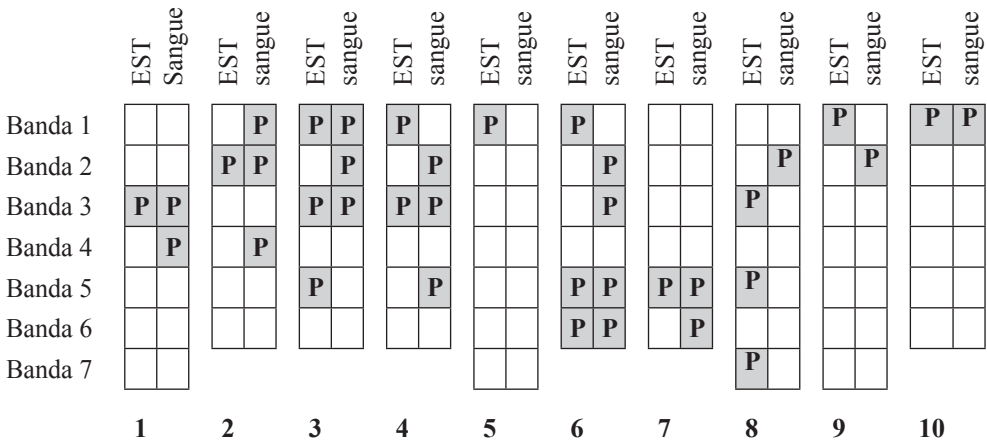
Ad ogni campionamento, indipendentemente dal tipo di materiale raccolto, è stata sufficiente la presenza di almeno un campione positivo per considerarlo positivo, viceversa sono stati considerati negativi i campionamenti con tutte le PCR negative. In questo modo è stato possibile elaborare un parallelismo in cui confrontare lo status relativo alla PRRS di ogni azienda, per ogni banda in fase di svezzamento, sulla base dei risultati della PCR eseguita sugli EST oppure sul sangue.

Tutti i risultati della PCR sono stati poi inseriti in una tabella di contingenza con l'obiettivo di confrontare lo status di ogni banda sulla base dell'esito della PCR realizzata su un diverso materiale biologico (seppur prelevati in tempi diversi nel ciclo produttivo). Questi dati hanno quindi permesso un confronto grazie all'utilizzo dell'Indice di Concordanza e del valore della K di Cohen.

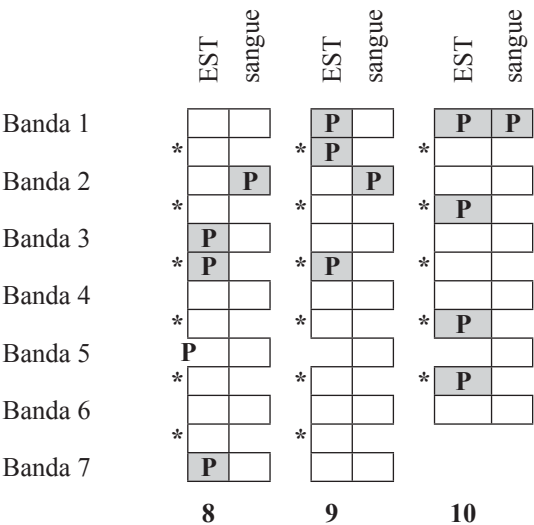
### **RISULTATI E DISCUSSIONE**

In tutti e dieci gli allevanti è stata rilevata circolazione virale durante il periodo di studio, con un valore medio di positività per quanto riguarda i campioni di EST pari a 32,07 ( $\pm 2,67$ ) Ct e  $2,24 \times 10^5$  copie virali ( $\pm 5,58 \times 10^5$ ) mentre i campioni di sangue identificati come positivi hanno mostrato valori medi di Ct pari a 29,01 ( $\pm 5,22$ ) con  $2,25 \times 10^7$  ( $\pm 8,41 \times 10^7$ ) copie virali. Il confronto tra lo status di ogni banda definito dagli esiti della PCR eseguita sugli EST e sul sangue mostra una corrispondenza non sempre perfetta (Figura 1), a fronte di 45 bande con status concorde ve ne sono 19 con attribuito un diverso status. Andando nel dettaglio della evoluzione cronologica di ogni allevamento ci sono quattro casi in cui lo status di positività viene rilevato più a lungo nel corso del tempo dall'analisi del sangue (allevamenti 1-2-4-7-9) rispetto a quello degli EST, mentre in tre casi (allevamenti 3-5-8) sono gli EST a rilevare una più persistente positività a fronte di campioni di sangue negativi. Le aziende con una routine settimanale (allevamenti 8-9-10), complete degli esiti delle PCR sugli EST di ogni settimana, mostrano come questi dati aggiuntivi portino una informazione più completa rispetto a quella

del solo prelievo ematico o dei soli EST raccolti ogni tre settimane, mostrando un numero maggiore di bande positive (Figura 2).  
 Il confronto tra lo status di ogni banda calcolato matematicamente ha stabilito una Concordezza del 69,0% e una k Cohen pari a 0,25.



**Figura 1.** Confronto tra lo status relativo alla PRRS basato sull’esito delle PCR eseguite sugli EST e sul sangue in pre-svezzamento. Per ognuno dei 10 allevamenti è stata evidenziata l’eventuale positività (P).  
**Figure 1.** Herd classification for PRRS based on PCR results performed on PF or blood samples in pre-weaning age. Positive status for each farm was underlined (P).



**Figura 2.** Status relativo alla PRRS delle tre aziende con bande settimanali. L’esito delle PCR eseguite sugli EST raccolti nelle due bande non sottoposte al prelievo ematico in pre-svezzamento è stato accorpato in un unico valore (\*).  
**Figure 2.** Herd classification for PRRS of 1-weeks BMS farms. The results of PCR performed on PF relative of two batches with no pre-weaning blood sampling were merged in a single data (\*).

I valori rilevati di Ct e copie genomiche sono stati di poco superiori nei campioni di sangue, rispetto a quelli di EST, dato già rilevato in letteratura (Vilalta et al., 2018), probabilmente dovuto all'effetto di diluizione che si ha negli EST.

Il dato ottenuto dalla analisi degli EST è frutto di un campionamento della popolazione più ampio rispetto la prelievo di sangue di 30 soggetti e ciò legittima una inferenza più attendibile (Vilalta et al., 2018). Inoltre l'utilizzo degli EST è stato provato con successo negli Stati Uniti come metodo di monitoraggio nel programma di eliminazione del virus in seguito a focolai di PRRS (Trevisan et al., 2019). Nel nostro studio, considerando singolarmente ogni banda e ponendo come test di riferimento quello effettuato sul sangue, l'analisi dei relativi EST sembra individuare alcune situazioni in cui l'utilizzo di questo materiale fornirebbe uno status falsamente negativo o falsamente positivo. In realtà il confronto viene fatto sullo stesso gruppo di animali ma in momenti diversi. La situazione a 3-4 giorni di vita (momento del prelievo degli EST) può essere diversa da ciò che si rileva 17-18 giorni dopo (prelievo ematico in pre-svezzamento) a seconda del momento in cui i soggetti si infettano. Infatti, i risultati di questo lavoro mostrano che lo studio della circolazione virale di un allevamento, basato esclusivamente sugli esiti forniti dagli EST ignora l'eventuale insorgenza di viremia successiva al momento della castrazione. È quindi normale che non ci sia una concordanza perfetta tra gli esiti dei due campionamenti perché mostrano la situazione in due momenti diversi, migliorando perciò la conoscenza della dinamica aziendale.

Un approccio coerente con quanto è stato rilevato, unito alla semplicità di esecuzione e all'affidabilità del metodo potrebbe essere quello di utilizzare gli EST come materiale diagnostico per un monitoraggio routinario in allevamenti endemicamente infetti. Tale procedura potrebbe incrementare la sensibilità del controllo se integrata secondo necessità, con un prelievo ematico in pre-svezzamento, così da massimizzare la possibilità di un successo diagnostico. In particolare, come suggerito da un recente lavoro (Trevisan et al., 2019), qualora si raggiungano almeno due campionamenti di EST con esito negativo si potrebbe procedere al successivo prelievo ematico in pre-svezzamento per confermare lo status di negatività.

## **CONCLUSIONI**

L'utilizzo degli EST può essere incluso come materiale diagnostico nei sistemi di monitoraggio del virus della PRRS, in particolare può essere utile nella comprensione del modello di circolazione virale all'interno di ogni allevamento. Il vantaggio dell'impiego di questo materiale sta nella semplice procedura di raccolta unita alla possibilità di avere un dato rappresentativo di tutto l'allevamento che qualora descriva una situazione con assenza di circolazione virale deve essere integrato con il ben noto monitoraggio con prelievo di sangue su suinetti in pre-svezzamento. In conclusione, gli EST sono da considerare un valido materiale diagnostico in supporto al prelievo ematico sui suinetti per una più accurata definizione dello status di un allevamento relativo al virus della PRRS.

## **RINGRAZIAMENTI**

Si ringraziano i colleghi Greta Tavella, Enrico Giacomini, Francesco Vantini e Giovanbattista Guadagnini per il prezioso contributo tecnico e per la collaborazione in campo, nonché tutti gli allevatori che hanno partecipato allo studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. 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.
3. Linhares, D. C., J. P. Cano, M. Torremorell, and R. B. Morrison, 2014, Comparison of time to PRRSV-stability and production losses between two exposure programs to control PRRSV in sow herds: *Prev Vet Med*, v. 116, p. 111-9.
4. Linhares, D. C. L., 2013, *Evaluation of Immune Management Strategies to Control and Eliminate Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV)*, University of Minnesota, Saint Paul.
5. Lopez, W. A., J. Angulo, J. J. Zimmerman, and D. C. L. Linhares, 2018, Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds using processing fluids: *Journal of Swine Health and Production*, v. 26, p. 146-150.
6. Tonni, M., A. M. Maisano, M. B. Boniotti, F. Ostanello, G. Leotti, F. Scali, G. Santucci, S. Andreoni, and G. L. Alborali, 2019, Preliminary results of comparison between different diagnostic protocols for PRRSV monitoring in suckling piglets: *Proceeding of XLV annual meeting SIPAS*, p. 171-176.
7. Trevisan, G., E. Jablonski, J. Angulo, W. A. Lopez, and D. C. L. Linhares, 2019, Use of processing fluid samples for longitudinal monitoring of PRRS virus in herds undergoing virus elimination: *Porcine health Management*, v. 2019.
8. 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.





# **SALIVA/FLUIDI ORALI VERSUS CAMPIONI DI SIERO: FATTIBILITÀ ED EFFICACIA DEL RILEVAMENTO DI ANTICORPI ANTI-SALMONELLA IN SUINI ALL'INGROSSO**

## **SALIVA/ORAL FLUID VERSUS BLOOD SAMPLING: FEASIBILITY AND PERFORMANCE OF ANTI-SALMONELLA ANTIBODIES DETECTION IN FINISHING PIGS**

DE LUCIA A.<sup>1,2</sup>, CAWTHRAW S.<sup>2</sup>, DAVIES R.<sup>2</sup>, SMITH R.P.<sup>3</sup>, BIANCO C.<sup>4</sup>,  
OSTANELLO F.<sup>1</sup>, MARTELLI F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy*

<sup>2</sup>*Animal and Plant Health Agency (APHA) Bacteriology Department, UK*

<sup>3</sup>*Animal and Plant Health Agency (APHA) Epidemiology Department, UK*

<sup>4</sup>*Animal and Plant Health Agency (APHA) Pathology Department, UK*

**Parole chiave:** Anticorpi anti-*Salmonella*, saliva, fluidi orali, siero, suini, ELISA

**Keywords:** *Salmonella* antibody, saliva, oral fluid, serum, pigs, ELISA

### **RIASSUNTO**

Negli allevamenti suini, uno dei principali fattori limitanti l'impiego della sorveglianza sierologica è rappresentato dai costi di prelievo. I fluidi orali (OF) costituiscono una promettente alternativa all'utilizzo del siero di sangue come matrice da utilizzare per la diagnosi indiretta delle malattie infettive negli allevamenti intensivi. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'uso di campioni salivari raccolti da suini all'ingrasso per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella*. Venti campioni individuali appaiati di siero e saliva e 4 campioni di gruppo (OF) sono stati raccolti e analizzati con un kit commerciale ELISA per la ricerca di anticorpi IgG anti-*Salmonella*. Per valutare il possibile utilizzo di pool, sono stati inoltre esaminati pool artificialmente creati a partire da 5 campioni di siero e saliva raccolti in ciascuno dei box esaminati. Nonostante i livelli anticorpali più bassi rispetto ai rispettivi campioni sierici, modificando il protocollo del test ELISA è stato possibile rilevare anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva e di OF. È stata evidenziata una correlazione positiva ( $\rho=0,66$ ;  $p<0,01$ ) con un valore di concordanza moderata ( $K>0,62$ ;  $p<0,01$ ) tra la concentrazione di IgG anti-*Salmonella* nei campioni individuali di siero e saliva. I campioni di OF rappresentano un pool di un numero più elevato di animali e sono risultati sempre positivi per anticorpi anti-*Salmonella*. I risultati di questo lavoro forniscono prove preliminari del fatto che i campioni di saliva possano rappresentare efficace alternativa ai campioni di sangue per la diagnosi di infezione da *Salmonella* negli allevamenti di suini.

### **ABSTRACT**

Surveillance in pig herds is constrained mainly by the cost-effectiveness and efficiency of sampling methods. Saliva samples obtained by using absorptive devices, can provide an alternative diagnostic matrix to serum for monitoring disease status in pigs. The aim of this study was to investigate the correlation of anti-*Salmonella* antibodies between serum and saliva samples collected from pigs. Twenty individual paired serum and saliva samples and 4 collective samples (OF) were collected from a single farm. Pooled serum and saliva samples were created by pooling five individual samples from each pen. Anti-*Salmonella* IgG was detected in individual serum samples using a commercial

*Salmonella* ELISA kit, validated for sera. The same kit was used with a protocol modified by extending incubation time and increasing temperature to test individual saliva samples. *Salmonella* IgG in pig saliva were always detected at a lower level than in the matching serum samples. A correlation ( $\rho=0.66$ ;  $p<0.01$ ) and a moderate agreement ( $K>0.62$ ;  $p<0.01$ ) was found between individual *Salmonella* IgG in serum and saliva samples. Both correlation and the agreement levels are moderate. Pools of saliva gave positive/negative results by ELISA that corresponded to those of the appropriate serum pools. Pen-based OFs represent a pool of higher number of animals and were always positive. The results of this work provide some evidence that saliva samples have the potential to be used for the diagnosis of *Salmonella* infection in pig farms.

## INTRODUZIONE

Nei paesi industrializzati *Salmonella spp* è il patogeno batterico più frequentemente isolato nei focolai epidemici di tossinfezione alimentare. L'epidemiologia della salmonellosi è un esempio convincente del paradigma *One Health* poiché per limitare l'incidenza dei casi umani occorre ridurre la prevalenza di *Salmonella* in allevamento e limitarne la dispersione nell'ambiente (Silva *et al.*, 2014).

Una parte significativa dei focolai umani è associata al consumo di carne suina contaminata (EFSA, 2018). Attualmente, però, la sorveglianza sierologica negli allevamenti di suini è limitata dai costi dei prelievi ematici e/o batteriologici e dai costi delle analisi di laboratorio (Ramirez *et al.*, 2012).

I campioni di fluido orale (*oral fluid* – OF) costituiscono una promettente alternativa all'utilizzo del siero di sangue come matrice da utilizzare per la diagnosi indiretta delle malattie infettive negli allevamenti suini (Decorte *et al.*, 2014; Fablet *et al.*, 2017; Prickett, 2009). L'OF è una miscela di secrezioni salivari e di trasudati mucosali; questi ultimi sono di derivazione ematica e contengono molti dei componenti presenti nel siero, inclusi gli anticorpi, e agenti patogeni che attraverso la mucosa possono essere trasferiti nella cavità orale e rilevati dall'esame dell'OF (Brandtzaeg, 2013; Taylor and Preshaw, 2016).

Nel suino, la raccolta dell'OF è facilmente realizzabile lasciando a disposizione degli animali una corda sospesa all'interno dei box che gli animali tenderanno a succhiare; l'OF verrà successivamente raccolto strizzando la corda. Dopo 30-60 minuti di esposizione all'interno di un box di 30 animali, circa il 75% dei suini avrà interagito con la corda. Se il numero di animali per box è superiore, è sufficiente aumentare il numero di corde, appendendole in aree diverse (White *et al.*, 2014). L'OF è quindi un campione collettivo molto rappresentativo degli animali presenti nel box. Inoltre, la procedura di raccolta dei campioni di OF è semplice, realizzabile anche da personale non sanitario ed economica (Prickett *et al.*, 2008). Considerando che la metodologia di raccolta dell'OF può variare, è importante utilizzare una terminologia standardizzata per descrivere accuratamente i campioni che ne risultano. In letteratura la saliva è definita come “il fluido ottenuto ... per espettorazione” mentre i fluidi orali come “il fluido ottenuto mediante l'inserimento di collettori assorbenti nella cavità buccale” (Atkinson *et al.*, 1993a). A seconda del metodo di raccolta o dell'utilizzo di stimolanti chimici per indurre il flusso salivare, i campioni ottenuti possono anche essere descritti come “stimolati o “non stimolati” (Olsen, 2012). I campioni raccolti mediante espettorazione o salivazione sono indicati come “non stimolati”, mentre i campioni ottenuti mediante l'utilizzo di materiali assorbenti sono di solito considerati “stimolati” (Atkinson *et al.*, 1993b; Olsen, 2012). Negli ultimi anni si è osservato un crescente interesse per l'utilizzo degli OF e numerosi studi hanno valutato il loro possibile utilizzo per la determinazione di immunoglobuline specifiche e/o agenti

patogeni di importanza per l'allevamento del suino (Prickett and Zimmerman, 2010). Tuttavia, per essere utilizzato come strumento di sorveglianza di routine, l'esame dei campioni di OF deve essere validato rispetto ai metodi standard di diagnosi.

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di ottimizzare i criteri interpretativi dei risultati e valutare le performances in termini di sensibilità e specificità di un test immunoenzimatico (ELISA) commerciale, validato per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella* nel siero, su tamponi salivari e campioni di OF raccolti in un allevamento intensivo di suini. È stata quindi valutata la concordanza dei risultati ottenuti dall'esame sierologico dei campioni di saliva e di OF con i risultati ottenuti dell'esame del siero degli stessi soggetti, che ha rappresentato il *gold-standard*.

## MATERIALI E METODI

### *Prelievo dei campioni*

Lo studio è stato condotto in un'azienda a ciclo chiuso di circa 500 scrofe. L'anamnesi riportava la presenza di problemi sanitari causati da *Salmonella* Typhimurim, con sintomatologia clinica nei suini svezzati. Durante la visita in allevamento sono stati raccolti 4 campioni di OF mediante l'applicazione di una corda all'interno di 4 box scelti in maniera casuale (box A, B, C, D ciascuno contenente 20 suini Large White di circa 17 settimane di età e 60-70 kg di peso). Successivamente, da 5 animali per ciascun box sono stati prelevati campioni individuali appaiati di saliva e di sangue. Il prelievo di saliva è stato eseguito su animali in posizione di stazione quadrupedale, utilizzando tamponi Salivette® fissati su un'asta di plastica sterile e tenuti nella cavità orale dei suini fino a quando non erano completamente imbevuti. Per aumentare la quantità di saliva raccolta da ciascun animale, sono stati utilizzati due tamponi. Dopo la raccolta, i tamponi sono stati refrigerati a 4°C e inviati al laboratorio nella stessa giornata. Le provette contenenti i tamponi Salivette® sono state successivamente centrifugate in condizioni di refrigerazione a 3000 × g per 10 minuti e il surnatante è stato conservato a -80°C fino all'esecuzione dell'esame sierologico (Escribano *et al.*, 2012; Gutiérrez *et al.*, 2009). Per ogni animale, la saliva ricavata da ciascuno dei 2 tamponi è stata miscelata ed esaminata per la ricerca di anticorpi anti-*Salmonella*. Utilizzando un volume uguale di saliva per ciascun suino, sono stati creati 4 pool di saliva dei cinque animali campionati in ciascun box. In maniera analoga, sono stati creati 4 pool di siero.

Contestualmente al prelievo individuale di saliva, da ognuno dei 4 box si è proceduto alla raccolta dell'OF, utilizzando corde di cotone come descritto in bibliografia (Prickett *et al.*, 2008; White *et al.*, 2014). In ciascun box è stata posizionata una corda e lasciata a disposizione degli animali per circa 30 minuti. Allo scadere del tempo, la corda è stata posta all'interno di un sacchetto di plastica sterile e l'OF è stato raccolto per strizzamento. Successivamente, l'OF estratto è stato trasferito in una provetta da 50 ml. I campioni sono stati mantenuti refrigerati fino alla consegna in laboratorio, dove gli OF sono centrifugati a 1500 × g per 10 minuti e conservati a -80°C fino all'esecuzione dell'esame sierologico (Dawson, 2015).

I risultati di una precedente indagine batteriologica nell'azienda oggetto di questo studio riportavano, nei suini in svezzamento, una prevalenza di *Salmonella* del 60%. Di conseguenza, il numero di campioni esaminati per box (5 campioni di saliva e siero per box di 20 animali) è stato calcolato in modo da garantire il 95% di probabilità di evidenziare almeno 1 campione positivo quando la sieroprevalenza è  $\geq 50\%$  (Miller *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). Come controlli negativi sono stati utilizzati cinque tamponi salivari e tre campioni di OF prelevati da scrofe *Salmonella*-free.

### *Rilevazione di anticorpi specifici per Salmonella mediante kit ELISA su campioni di saliva, OF e siero di sangue*

La ricerca di anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva, siero e OF, è stata condotta usando un kit commerciale ELISA indiretta (IDEXX Swine Salmonella Ab Test), validato per ricerca di IgG anti-*Salmonella* nel siero e nel *meat juice*.

I campioni di saliva e di siero sono stati esaminati prima singolarmente e, successivamente, in pool. I 4 pool di saliva e siero sono stati creati utilizzando volumi uguali di ogni matrice diagnostica prelevata da ciascuno dei cinque animali selezionati all'interno dei 4 box.

I campioni di siero individuali e in pool sono stati esaminati in duplicato, seguendo le istruzioni del produttore. Per i campioni individuali di saliva, i pool di saliva e l'OF, il protocollo di analisi suggerito dalla casa produttrice del kit ELISA è stato in parte modificato. Nello specifico, è stata utilizzata una diluizione 1:1 del campione; tale diluizione è risultata essere quella più efficace nel rilevare differenze tra gli animali, usando un volume minimo (50 µl) di campioni di saliva, pool di saliva e OF. I campioni, esaminati in duplicato, sono stati successivamente incubati ad una temperatura superiore (37°C) e per un periodo di tempo maggiore (2 ore) rispetto a quanto indicato dal produttore. Le fasi successive all'incubazione sono state realizzate secondo le indicazioni del produttore del kit ELISA.

I cinque campioni negativi di saliva e i tre campioni di OF raccolti da suini *Salmonella*-free sono stati rispettivamente aggregati in pool e inclusi in ciascuna piastra come controlli negativi. Il rapporto S/P è stato calcolato utilizzando i valori di lettura del siero di controllo negativo fornito con il kit ELISA.

### *Analisi statistica*

Per valutare la correlazione tra i valori ELISA S/P ottenuti dall'esame dei campioni individuali di saliva e siero è stato calcolato il coefficiente di correlazione non parametrico *rho* di Spearman. La concordanza tra i risultati (positivo/negativo) dei campioni individuali di saliva e siero raccolti dagli stessi animali è stata valutata utilizzando il coefficiente Kappa di Cohen (*K*). I valori di cut-off ottimali per l'interpretazione dei valori S/P ottenuti dall'analisi dei campioni di saliva e OF sono stati determinati attraverso la curva ROC. È stata inoltre calcolata la sensibilità (*Se*) e la specificità (*Sp*) relativa del test ELISA eseguito su saliva e OF rispetto al *gold standard* rappresentati dall'esame ELISA dei sieri. Il test di Kolmogorov-Smirnov è stato utilizzato per verificare la normalità della distribuzione dei dati e, sulla base dei risultati di questo test, sono stati utilizzati il test U di Mann-Whitney e il test H di Kruskal-Wallis per confrontare i valori S/P dei campioni di siero e saliva rispettivamente a livello di box e di popolazione campionata. L'analisi dei dati è stata realizzata utilizzando il software SPSS 23.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata ad un valore di  $p < 0,05$ .

## **RISULTATI**

La raccolta della saliva individuale mediante l'utilizzo di due tamponi ha permesso di ottenere circa di  $467 \pm 102$  µl (media  $\pm$  SEM) di saliva per ciascun animale. La raccolta dell'OF mediante le corde ha invece consentito di raccogliere un volume maggiore (3-8 ml), più che sufficiente per eseguire diverse determinazioni analitiche.

In tabella 1 vengono riportati i risultati della valutazione, mediante test ELISA commerciale, della quantità di IgG anti-*Salmonella* rilevata nei campioni di siero, saliva e OF. In generale, i valori S/P ottenuti dall'esame dei campioni individuali di saliva sono significativamente inferiori rispetto ai valori S/P dei sieri corrispondenti ( $U=0,00$ ;  $p < 0,001$ ) (Tabella 1 e Figura 1).

Analogamente, considerando ciascuno dei 4 box, i valori S/P dei sieri individuali sono risultati essere sempre superiori rispetto ai valori S/P dei corrispondenti campioni di saliva ( $U=0,00$   $p=0,03$ ;  $U=0,00$   $p=0,01$ ;  $U=0,00$   $p=0,01$ ;  $U=0,00$   $p=0,01$  rispettivamente nei box A, B, C, D). Nessuna differenza significativa è stata invece evidenziata per i valori S/P dei sieri e i valori S/P dei campioni di saliva tra i 4 box (rispettivamente:  $H=5,94$   $p=0,12$  e  $H=2,87$ ;  $p=0,41$ ).

L'analisi statistica ha permesso di stabilire una correlazione positiva tra i valori S/P degli anticorpi anti *Salmonella* rilevati nei sieri e nei campioni individuali di saliva ( $\rho=0,66$ ;  $p=0,002$ ) (Figura 1).

L'analisi della curva ROC ha evidenziato che la migliore correlazione (Area sotto la curva, AUC: 90,0%) tra i risultati ELISA ottenuti dall'esame della saliva e del siero si ottiene con un valore di S/P dei campioni di saliva  $\geq 0,03$ . Utilizzando come valore di cut-off  $S/P \geq 0,03$ , l'esame dei campioni di saliva ha una Se dell'86% (95%CL: 57-98) e una Sp dell'80% (95%CL: 28-99), rispetto ai risultati ELISA ottenuti esaminando i campioni di siero (Tabella 2).

Il calcolo del coefficiente Kappa di Cohen ha evidenziato una concordanza moderata ( $K > 0,62$ ;  $p=0,002$ ) tra le due matrici esaminate: il *gold standard*, rappresentato dal siero (considerato positivo per valori  $S/P > 1,00$ ) e i campioni di saliva (considerati positivi per valori  $S/P > 0,03$ ). Solo due dei suini positivi all'esame del siero sono risultati negativi all'esame dei campioni di saliva.

In 3 dei 4 box esaminati, quando i campioni individuali di saliva o siero degli animali selezionati da ciascun box sono stati miscelati tra loro, si è ottenuto un risultato positivo all'esame dei pool anche quando nel campione collettivo erano presenti campioni individuali negativi di siero o saliva (box B, C e D) (Tabella 1).

Per quanto riguarda il box A, a causa della scarsità del materiale raccolto, è stato possibile creare i pool di siero e saliva miscelando solo due campioni (dei 5 raccolti), di cui uno positivo e uno negativo al test ELISA. L'esame dei pool di saliva e siero ottenuti ha fornito, entrambi i casi, un esito negativo.

In 3 dei 4 box esaminati, oltre il 50% dei campioni individuali di siero era positivo e anche i rispettivi campioni di OF sono risultati positivi al test ELISA. Nel box D, nonostante solo 2 dei 5 campioni individuali di siero siano risultati positivi al test ELISA, il corrispondente campione di OF è risultato positivo.

## DISCUSSIONE

Questo lavoro ha evidenziato la possibilità di ottimizzazione un test commerciale ELISA, messo a punto per l'esame del siero, per la ricerca di anticorpi anti *Salmonella* su matrici alternative al sangue.

Modificando il protocollo di esecuzione del test commerciale IDEXX ELISA, è stato possibile rilevare la presenza di anticorpi anti-*Salmonella* nei campioni di saliva e di OF raccolti da suini all'ingrasso di un allevamento intensivo. Il protocollo di esecuzione del kit ELISA è stato parzialmente modificato, partendo dal presupposto che la concentrazione di anticorpi nei campioni di saliva e di OF sia inferiore rispetto a quella presente nel siero. Nello specifico, è stata utilizzata una diluzione inferiore del campione e modificati i tempi e le temperature di incubazione per favorire il legame tra gli anticorpi anti-*Salmonella* potenzialmente presenti nei campioni di saliva e OF e l'antigene che riveste la piastra ELISA. Tali modifiche hanno consentito di ottenere dei valori di Se e Sp diagnostica dell'esame delle matrici alternative al sangue (saliva e OF), rispettivamente del 86% e 80% rispetto al *gold standard* rappresentato dall'esame del siero ematico (Tabella 2).

**Tabella 1:** IgG anti-*Salmonella* rilevate nei campioni di siero e saliva (individuali e pool) e nei campioni di gruppo (OF). I valori di cut-off di S/P >1 e S/P>0,03 sono stati utilizzati rispettivamente per siero e saliva/OF per discriminare gli animali positivi da quelli negativi. I pool di siero e saliva del box A sono stati allestiti utilizzando solo i campioni individuali degli animali 3 e 4.

**Table 1:** Anti-*Salmonella* ELISA IgG OD values of individual and pool samples of serum and saliva and pen-based OF. Positive samples are chosen in accordance with the S/P >1 for the serum and S/P>0.03 for saliva and OF samples. Serum and saliva pools of pen A were prepared by pooling only samples from animal 3 and animal 4.

| Box | Suino n. | Campioni individuali di siero |           |         | Campioni individuali di saliva |           |         | Pool di siero |           |         | Pool di saliva |           |         | Campioni di OF |           |         |
|-----|----------|-------------------------------|-----------|---------|--------------------------------|-----------|---------|---------------|-----------|---------|----------------|-----------|---------|----------------|-----------|---------|
|     |          | OD                            | S/P ratio | pos/neg | OD                             | S/P ratio | pos/neg | OD            | S/P ratio | pos/neg | OD             | S/P ratio | pos/neg | OD             | S/P ratio | pos/neg |
| A   | 1        | 3,23                          | 2,95      | pos     | 0,27                           | 0,20      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| A   | 2        | 1,25                          | 1,17      | pos     | 0,76                           | 0,71      | pos     | 0,79          | 0,67      | neg     | 0,09           |           | neg     | 0,35           |           | pos     |
| A   | 3        | 1,15                          | 1,05      | pos     | 0,29                           | 0,22      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| A   | 4        | 0,78                          | 0,91      | neg     | 0,08                           | 0,02      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| B   | 6        | 2,82                          | 2,85      | pos     | 0,10                           | 0,04      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| B   | 7        | 2,75                          | 2,77      | pos     | 0,22                           | 0,15      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| B   | 8        | 3,39                          | 3,46      | pos     | 0,30                           | 0,23      | pos     | 2,63          | 2,45      | pos     | 0,32           |           | pos     | 0,54           |           | pos     |
| B   | 9        | 1,26                          | 1,18      | pos     | 0,15                           | 0,07      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| B   | 10       | 3,20                          | 2,93      | pos     | 0,73                           | 0,63      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| C   | 11       | 0,98                          | 0,87      | neg     | 0,07                           | 0,00      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| C   | 12       | 1,39                          | 1,32      | pos     | 0,34                           | 0,27      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| C   | 13       | 3,32                          | 3,38      | pos     | 0,83                           | 0,73      | pos     | 2,19          | 2,03      | pos     | 0,33           |           | pos     | 0,35           |           | pos     |
| C   | 14       | 1,59                          | 1,53      | pos     | 0,23                           | 0,16      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| C   | 15       | 1,11                          | 1,02      | pos     | 0,06                           | 0,00      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| D   | 16       | 0,87                          | 0,76      | neg     | 0,09                           | 0,03      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| D   | 17       | 0,96                          | 0,86      | neg     | 0,08                           | 0,00      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| D   | 18       | 1,00                          | 0,90      | neg     | 0,09                           | 0,01      | neg     | 1,37          | 1,23      | pos     | 0,28           |           | pos     | 0,38           |           | pos     |
| D   | 19       | 1,25                          | 1,26      | pos     | 0,05                           | 0,00      | neg     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |
| D   | 20       | 2,36                          | 2,35      | pos     | 0,46                           | 0,38      | pos     |               |           |         |                |           |         |                |           |         |

È stata evidenziata una correlazione positiva tra i valori S/P dei campioni di siero e dei corrispondenti campioni individuali di saliva. Ciò indica che i campioni individuali di saliva possono rappresentare una valida alternativa ai campioni di sangue per la rilevazione di anticorpi anti-*Salmonella*.

In accordo con quanto già noto (Olsen *et al.*, 2013), i livelli di IgG anti-*Salmonella* rilevati nei sieri dei suini esaminati sono risultati essere sempre superiori rispetto ai livelli anticorpali riscontrati nei rispettivi campioni di saliva ( $p>0,05$ ). Analogamente a quanto si verifica quando si comparano i risultati dell'esame di campioni di sangue e di *meat juice* ottenuti dagli stessi animali (Wallander *et al.*, 2015), i suini i cui sieri presentavano valori S/P di poco superiori al valore di cut-off del kit ELISA potrebbero avere quantità di IgG nella saliva al di sotto del limite di rilevanza del test.

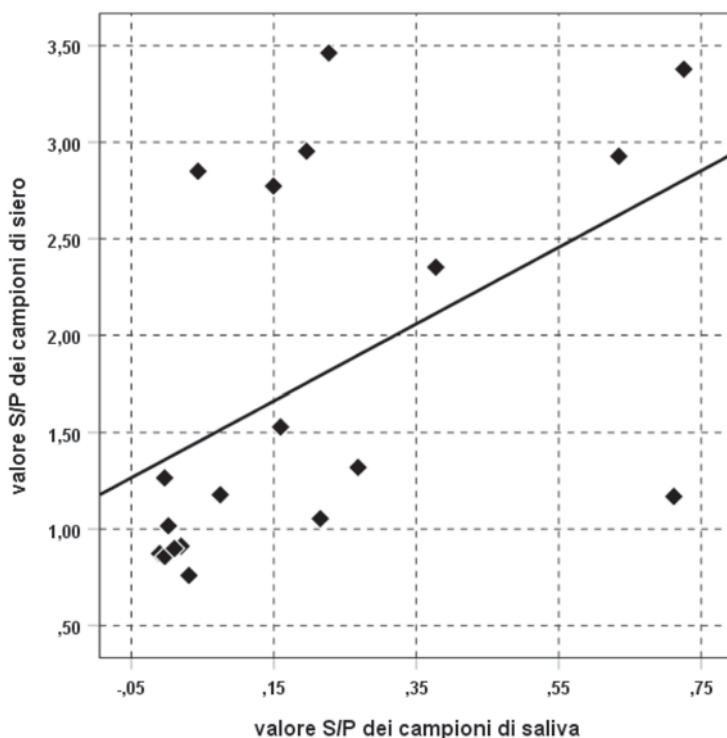


Nel corso di questo studio, due suini sono risultati positivi all'esame del siero ma negativi all'esame dei campioni di saliva. Ciò può essere imputato alla bassa positività riscontrata nei due sieri, per i quali sono stati rilevati valori di S/P di poco superiori al valore di cut-off del kit ELISA.

L'utilizzo dei pool è interessante poiché permette di esaminare più individui contemporaneamente con un costo unitario inferiore e, allo stesso tempo, di accertare la presenza della malattia all'interno del gruppo (box). Tuttavia, nell'utilizzo dei pool è importante che le prestazioni analitiche dei kit utilizzati rimangano elevate. Dei quattro pool di sieri o di saliva analizzati in questo studio, tre hanno dato esito positivo al test ELISA (box B, C e D), anche quando i pool erano composti dall'aggregazione di campioni individuali positivi e negativi. Al contrario, è probabile che per il box A l'effetto di diluizione derivante dall'utilizzo dei pool abbia causato una perdita di sensibilità, portando a un risultato negativo al test ELISA. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che, per questo box, solo due dei cinque campioni prelevati hanno contribuito alla costituzione del pool esaminato.

**Figura 1:** Correlazione tra i valori S/P di IgG anti-*Salmonella* ottenuti dall'esame mediante test ELISA di campioni individuali di siero e saliva raccolti da suini all'ingrasso.

**Figure 1:** Correlation between anti-*Salmonella* ELISA IgG S/P ratio values of individual serum and matching S/P ratio saliva samples collected from finisher pigs.





**Tabella 2:** Campioni di siero e saliva positivi e negativi per anticorpi IgG anti-Salmonella. Il coefficiente kappa di Cohen indica un accordo sostanziale tra i risultati ( $K=0,62$ ).

**Table 2:** *Number of porcine serum and saliva samples positive and negative for anti-Salmonella IgG antibodies. Cohen's kappa coefficient showed a substantial agreement ( $K=0.62$ ).*

|                                                     |          | Presenza di anticorpi anti-Salmonella nella saliva (%) |                         |         |
|-----------------------------------------------------|----------|--------------------------------------------------------|-------------------------|---------|
|                                                     |          | positivo                                               | negativo                | totale  |
| Presenza di anticorpi anti-Salmonella nel siero (%) | Positivo | 12 (85,7)                                              | 2 (14,3)                | 14      |
|                                                     | Negativo | 1 (20,0)                                               | 4 (80,0)                | 5       |
|                                                     | Totale   | 11 (57,9)                                              | 8 (42,1)                | 19      |
|                                                     |          | Se: 86% (95% CL: 57-98)                                | Sp: 80% (95% CL: 28-99) | K: 0,62 |

La possibilità che la miscelazione di campioni individuali positivi con campioni negativi porti la concentrazione degli analiti (es. anticorpi) al di sotto della soglia di rilevanza della metodica diagnostica (causando così una falsa negatività), è il principale limite all'uso dei pool come matrice diagnostica. La possibilità che gli anticorpi target vengano "diluisti" al di sotto del valore di cut-off del metodo, dipende dalle concentrazioni relative degli stessi analiti presenti in ciascun campione individuale. È dunque necessario utilizzare test diagnostici con un'alta sensibilità analitica per consentire l'utilizzo dei pool come procedura di screening dello stato sanitario ed epidemiologico della popolazione (Arnold *et al.*, 2009; Arnold *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2003; De Lucia *et al.*, 2019).

La raccolta dei fluidi orali (OF) mediante l'impiego di corde assorbenti rappresenta un'altra modalità per ridurre i costi di prelievo e di analisi. Infatti, l'OF raccolto da una singola corda è un campione rappresentativo dei 30 animali presenti nel box. I campioni di OF raccolti nei box con una elevata prevalenza individuale di sieri positivi alla ricerca di anticorpi anti-Salmonella ( $\geq 50$ ) sono risultati positivi al test ELISA (Tabella 1) (Miller *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2017). Gli OF sono risultati positivi per anticorpi anti-Salmonella anche quando la maggior parte dei campioni individuali di siero erano negativi (box D). Ciò è presumibilmente dovuto agli alti livelli di anticorpi specifici presenti nei campioni individuali positivi.

I risultati di questo studio preliminare indicano che i campioni collettivi (es. OF) possono rappresentare una utile matrice biologica da utilizzare per lo screening di *Salmonella* in allevamento. Tuttavia sono necessarie ulteriori ricerche per confermare questi risultati preliminari. In particolare, per l'efficace utilizzo dei campioni di gruppo come strumento di monitoraggio delle malattie infettive nell'allevamento del suino, è necessaria una maggiore comprensione delle performances diagnostiche (specificità e sensibilità) dei test utilizzati per l'esame di pool e il possibile effetto diluizione ad esso correlato.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Department for Environment, Food and Rural Affairs (UK) e IDT Biologika per avere supportato questo studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arnold M., Mueller-Doblies D., Carrique-Mas J., Davies R. (2009). The estimation of pooled-sample sensitivity for detection of *Salmonella* in turkey flocks. *Journal of applied microbiology* 107, 936-943.
2. Arnold M.E., Cook A., Davies R. (2005). A modelling approach to estimate the sensitivity of pooled faecal samples for isolation of *Salmonella* in pigs. *Journal of the Royal Society Interface* 2, 365-372.

3. Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., Mandel I., Navazesh M., Tabak L. (1993a). Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694.
4. Atkinson J., Dawes C., Ericson T., Fox P., Gandara B., Malamud D., Mandel I., Navazesh M., Tabak L. (1993b). Guidelines for saliva nomenclature and collection. *Annals of the New York Academy of Sciences* 694.
5. Brandtzaeg P. (2013). Secretory immunity with special reference to the oral cavity. *Journal of oral microbiology* 5, 20401.
6. Davies R., Heath P., Coxon S., Sayers A. (2003). Evaluation of the use of pooled serum, pooled muscle tissue fluid (meat juice) and pooled faeces for monitoring pig herds for *Salmonella*. *Journal of applied microbiology* 95, 1016-1025.
7. Dawson L.L. (2015). Oral fluid as a non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs. Newcastle University,
8. De Lucia A., Rambaldi M., Ostanello F. (2019). Oral fluids, meat juice, and processing fluids: non-invasive alternative diagnostic medium for disease monitoring in pigs. *Large Animal Review* 25, 25-33.
9. Decorte I., Van Breedam W., Van der Stede Y., Nauwynck H.J., De Regge N., Cay A.B. (2014). Detection of total and PRRSV-specific antibodies in oral fluids collected with different rope types from PRRSV-vaccinated and experimentally infected pigs. *BMC Vet Res* 10, 134.
10. EFSA (2018). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. *EFSa Journal* 16, e05500.
11. Escribano D., Gutiérrez A., Subiela S.M., Tecles F., Cerón J. (2012). Validation of three commercially available immunoassays for quantification of IgA, IgG, and IgM in porcine saliva samples. *Research in veterinary science* 93, 682-687.
12. Fablet C., Renson P., Pol F., Dorenlor V., Mahé S., Eono F., Eveno E., Le Dimna M., Liegard-Vanhecke D., Eudier S., (2017). Oral fluid versus blood sampling in group-housed sows and finishing pigs: feasibility and performance of antibody detection for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Veterinary microbiology* 204, 25-34.
13. Gutiérrez A., Martínez-Subiela S., Eckersall P., Cerón J. (2009). C-reactive protein quantification in porcine saliva: a minimally invasive test for pig health monitoring. *The Veterinary Journal* 181, 261-265.
14. Miller A., Twomey D., Davies R., Teale C., Williamson S., Reichel R., Featherstone C., Cook A., Snow L., Armstrong J. (2011). *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance patterns on a sample of high seroprevalence pig farms in England and Wales (2003–2008). *Zoonoses and public health* 58, 549-559.
15. Olsen C., Karriker L., Wang C., Binjawadagi B., Renukaradhya G., Kittawornrat A., Lizano S., Coetzee J., Main R., Meiszberg A., (2013). Effect of collection material and sample processing on pig oral fluid testing results. *The Veterinary Journal* 198, 158-163.
16. Olsen C.W. (2012). Sampling considerations pertinent to the detection of analytes in swine oral fluids. Iowa State University.
17. Prickett J., Simer R., Christopher-Hennings J., Yoon K.-J., Evans R.B., Zimmerman J.J. (2008). Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 156-163.
18. Prickett J.R. (2009). Detection of viral pathogens of swine using oral fluid specimens. Iowa State University.
19. Prickett J.R., Zimmerman J.J. (2010). The development of oral fluid-based diagnostics

- and applications in veterinary medicine. *Animal Health Research Reviews* 11, 207-216.
20. Ramirez A., Wang C., Prickett J.R., Pogranichniy R., Yoon K.J., Main R., Johnson J.K., Rademacher C., Hoogland M., Hoffmann P., Kurtz A., Kurtz E., Zimmerman J. (2012). Efficient surveillance of pig populations using oral fluids. *Preventive veterinary medicine* 104, 292-300.
  21. Silva C., Calva E., Maloy S. (2014). One health and food-borne disease: Salmonella transmission between humans, animals, and plants. *One Health: People, Animals, and the Environment*, 137-148.
  22. Smith R.P., Andres V., Dormer L., Gosling R., Oastler C., Davies R.H. (2017). Study of the impact on Salmonella of moving outdoor pigs to fresh land. *Epidemiology & Infection* 145, 1983-1992.
  23. Taylor J.J., Preshaw P.M. (2016). Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontology* 2000 70, 7-10.
  24. Wallander C., Frössling J., Vågsholm I., Burrells A., Lundén A. (2015). "Meat juice" is not a homogeneous serological matrix. *Foodborne pathogens and disease* 12, 280-288.
  25. White D., Rotolo M., Olsen C., Wang C., Prickett J., Kittawornrat A., Panyasing Y., Main R., Rademacher C., Hoogland M. (2014). Recommendations for pen-based oral-fluid collection in growing pigs. *Journal of Swine Health and Production* 22, 138-141.

# **RIDURRE IL CONSUMO DI ANTIBIOTICO: RISULTATI DI UN PROGETTO PSR IN 30 AZIENDE DELL' EMILIA ROMAGNA NEL TRIENNIO 2016-2018**

## **A THREE YEARS SURVEY ON ANTIMICROBIAL USE IN A SAMPLE OF 30 SWINE FARMS IN EMILIA ROMAGNA (ITALY)**

BASSIP<sup>1</sup>., TREVISI P<sup>2</sup>., SALVARANI C<sup>2</sup>., PANGALLO G<sup>1</sup>., SCALI F<sup>1</sup>., LUPPI A<sup>1</sup>.,  
RUGNAG<sup>1</sup>., MOTTAV<sup>2</sup>., DIEGOLIG<sup>3</sup>., MERIALDI G<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

<sup>2</sup> Università di Bologna - Dipartimento di Scienze e tecnologie agro-alimentari (DISTAL)

<sup>3</sup> Servizio Veterinario Regione Emilia-Romagna

**Parole chiave:** antibioticoresistenza, antibiotico, colistina, HPCIA, linee guida

**Keywords:** antimicrobial-resistance, antibiotics, colistin, HPCIA, guidelines

### **RIASSUNTO**

L'impiego imprudente dell'antibiotico in zootecnia è un fattore di rischio per la diffusione di cloni antibiotico-resistenti negli animali e nell'uomo. In questo studio vengono presentati gli andamenti di consumo di antibiotico dal 2016 al 2018 in 30 aziende suinicole dell'Emilia Romagna partecipanti ad un progetto (PSR n. 5005479) rivolto alla riduzione dell'uso di antibiotico. Durante il triennio sono state organizzate, per allevatori e veterinari, attività formative inerenti all'uso prudente dell'antibiotico ed è stato distribuito materiale informativo, tra cui le linee guida per l'uso prudente dell'antibiotico pubblicate dalla Regione Emilia Romagna. La somministrazione di antibiotico complessivo (DDDAit), si è ridotta in scrofe (-52.7%), suinetti svezzati (-42.4%) e ingrassi (-40.9%), mentre è lievemente aumentata nei lattonzoli (+9.9%). Il consumo di antibiotico critico (HPCIA) è stato ridotto considerevolmente in tutte le categorie: scrofe (-57.4%), lattonzoli (-22.8%), suinetti svezzati (-92.2%) e ingrassi (-92.9%). Tra i HPCIA, la riduzione più rilevante riguarda la colistina nei suinetti (-98.7%). I risultati mostrano la rilevanza che l'attività formativa può avere sulla riduzione dell'antibiotico in allevamento, in assenza di investimenti onerosi; tuttavia è importante sottolineare come l'intervento normativo emanato nel 2016 riguardante la revoca dell'AIC ai prodotti contenenti colistina in associazione, sia stato significativo per il raggiungimento dei risultati presentati.

### **ABSTRACT**

The antimicrobial use (AMU) is a crucial issue in the development and spreading of antimicrobial resistance. From 2016 to 2018 the AMU of thirty pig farms (2 farrowing, 4 farrowing-weaning, 1 weaning, 20 fattening and 3 farrow-to-finish) in Emilia Romagna (Italy) was calculated. Regional guidelines on prudent AMU and informative materials about management of infectious diseases, were distributed and discussed with the farmers and their veterinarians at the start of the project and during yearly meetings. AMU was calculated as number of DDDAit (Defined Daily Doses Animal for Italy) and yearly reports were distributed and discussed. During the study, overall AMU decreased in weaners (-42.4%), sows (-52.7%) and fatteners (-40.9%), while an increase was reported in piglets (+9.9%). Referring to HPCIA (WHO's Highest Priority Critically Important Antimicrobials), a reduction was recorded in all the categories: fatteners (-92.9%), weaners (-92.2%), sows (-57.4%) and piglets (-22.8%) with a decline in colistin consumption that reached a -98.7 %

in weaners. This study highlights the relevance that education activities on antimicrobials administration and disease prevention and management may have on overall and HPCIA's AMU in Italian pig farms. Nevertheless, the ban of the use of colistin in association with other antimicrobials, intervened during the first year of the project, could have also had an impact on HPCIA and AMU reduction.

## INTRODUZIONE

L'impiego imprudente dell'antibiotico in zootecnia rappresenta un fattore di rischio per l'insorgenza e la diffusione di cloni antibiotico-resistenti nelle popolazioni animali e nell'uomo. L'Italia si colloca tra i maggiori consumatori di antibiotico ad uso veterinario in Europa (EMA 2019), a questo proposito è stato avviato nel 2017 il Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico - Resistenza (PNCAR) che affronta il problema coinvolgendo diverse aree della medicina umana e veterinaria ponendo obiettivi a breve e lungo termine. In particolare, riguardo al settore veterinario, gli obiettivi da raggiungere nel 2020 sono la riduzione del 30% di consumo di antibiotico complessivo e di quello somministrato per via orale, il calo del 10% di consumo antibiotico critico (*Highest Priority Critically Important Antimicrobials* HPCIA – WHO 2019) e la diminuzione delle vendite di colistina al di sotto di 5 mg/PCU (*Population Correction Unit*). In questo contesto la Regione Emilia Romagna ha pubblicato, nel 2017, le "Linee guida per l'uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento del suino", allo scopo di fornire uno strumento di facile consultazione per coadiuvare allevatori e veterinari nella razionalizzazione dell'impiego di antibiotico. All'interno del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020, è stato approvato il progetto PSR RER 5005479 finalizzato alla riduzione del consumo di antibiotico del 20% in 30 aziende suinicole dell'Emilia Romagna attraverso l'applicazione di buone pratiche di allevamento e gestione del farmaco. Il progetto prevedeva il monitoraggio annuale del consumo di antibiotico nel triennio considerato, abbinato all'individuazione di punti critici in azienda e all'organizzazione di corsi di formazione e incontri divulgativi sull'uso prudente dell'antibiotico e sulla gestione di biosicurezza, diagnosi e profilassi delle malattie infettive.

## MATERIALI E METODI

Il campione aziende suinicole (n 30) coinvolte nel progetto era composto da 2 allevamenti da riproduzione, 4 allevamenti con riproduzione svezzamento, 1 svezzamento, 20 ingrassi e 3 cicli chiusi. Lo studio si è svolto da Gennaio 2017 a Marzo 2019, raccogliendo i dati di consumo dell'antibiotico retrospettivamente per gli anni 2016, 2017 e 2018. Il consumo di antibiotico è stato calcolato annualmente estrapolando i mg totali utilizzati di ogni classe antibiotica dai registri di trattamento e di carico-scarico delle scorte, indicando la categoria produttiva a cui erano stati somministrati (scrofe, lattonzoli, suinetti svezzati e ingrassi). Ad ogni categoria sono stati assegnati i seguenti pesi standard al trattamento: 240 kg per le scrofe, 4 kg per i lattonzoli, 12 kg per i suinetti svezzati e 100 kg per gli ingrassi. Il numero di DDDAit (*Defined Daily Dose Animal*) consumate per animale di ogni categoria è stato calcolato dall'applicativo sviluppato da IZSLER durante gli studi di validazione del sistema ministeriale *ClassyFarm* ([www.classyfarm.it](http://www.classyfarm.it)) tramite la formula:

$$\sum_{i=1}^n \frac{mg \text{ PAi consumato}}{DDDAit \left( \frac{mg}{kg} \text{ pv die} \right) * animali (n) * peso standard (kg)}$$

I risultati sono stati espressi come consumo di antibiotico complessivo (AMU – *Antimicrobial use*) e di antibiotico critico (HPCIA), per via di somministrazione (orale tramite soluzioni o polveri, orale tramite premiscele e parenterale) e per categoria produttiva (scrofe, lattonzoli, suinetti svezzati e ingrassi). Sono stati considerati tra i principi attivi HPCIA: cefalosporine di III e IV generazione, chinoloni, colisina e macrolidi (WHO, 2019). Annualmente sono stati elaborati report aziendali contenenti i dati di consumo e le criticità osservate in azienda: i report presentavano i dati analizzati individuando le categorie produttive con i maggiori consumi di AMU e HPCIA e paragonando i consumi aziendali a quelli del campione complessivo suddiviso in quartili, tramite una rappresentazione schematica “a termometro” (Figura 1). Inoltre, per il 2017 e 2018, era evidenziato l’andamento dei consumi di antibiotico raffrontato a quello degli anni precedenti, evidenziando la progressione dell’allevamento nel tempo. I report aziendali, le linee guida per l’uso prudente dell’antibiotico e materiale informativo appositamente redatto (manuale di biosicurezza e schema dei principi attivi rientranti nelle classi HPCIA) sono stati distribuiti agli allevatori e ai veterinari aziendali durante incontri annuali formativi inerenti all’uso appropriato dell’antibiotico, la diagnosi e la profilassi delle malattie infettive e la biosicurezza.

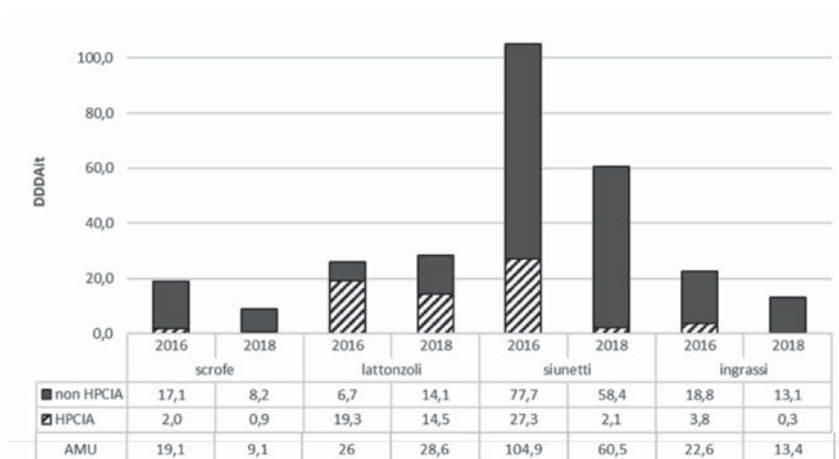


**Figura 1:** Rappresentazione grafica con aspetto a “termometro” (dal verde a sinistra al rosso a destra) del posizionamento del consumo di antibiotico complessivo e di HPCIA per classe produttiva di un’azienda, rispetto al campione analizzato suddiviso in quartili.

**Figure 1:** representation of total AMU and HPCIA consumption of a single farm compared to the sample. From the left to the right the four quartiles are represented with colors (green to red).

## RISULTATI

Al primo rilevamento, relativo all’anno 2016, i consumi maggiori di antibiotico complessivo e di HPCIA erano riferibili ai trattamenti effettuati nei suinetti svezzati (rispettivamente 104.9 DDDAit e 27.3 DDDAit), a cui facevano seguito i trattamenti somministrati ai lattonzoli (26 DDDAit e 19.3 DDDAit) e agli ingrassi (22.6 DDDAit e 3.8 DDDAit), mentre nelle scrofe venivano registrati i consumi minori (19.1 DDDAit e 2.0 DDDAit) (Figura 2). I consumi relativi al 2018 mostrano una riduzione incisiva del consumo di antibiotico nella categoria con i maggiori consumi iniziali (-42.4%), ovvero i suinetti svezzati, dove si mantiene comunque il primato dei trattamenti. Un’importante diminuzione di antibiotico complessivo e di HPCIA somministrati è stata registrata anche negli ingrassi (rispettivamente -40.9% e -92.9%) e nelle scrofe (rispettivamente -52.7% e -57.4%), mentre nei lattonzoli si è ridotto il consumo di HPCIA (-22.8%), ma è lievemente aumentato il consumo di antibiotico complessivo (+9.9%) (Figura 2).

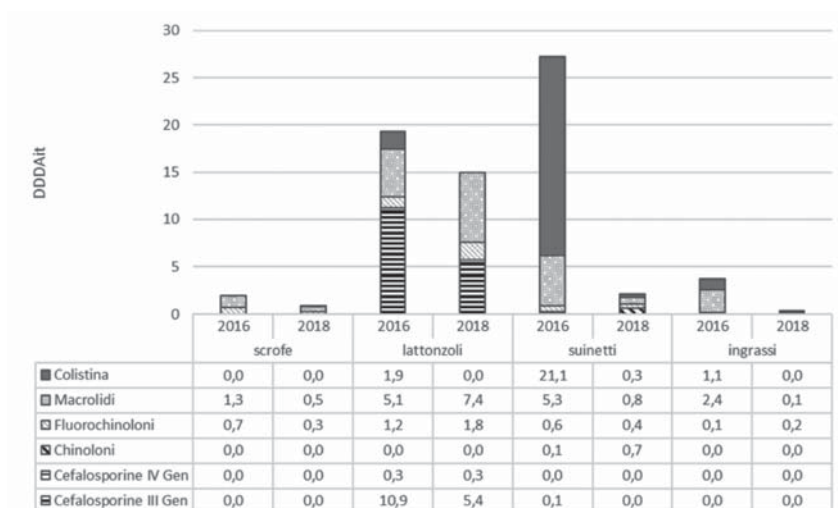


**Figura 2:** consumo di antibiotico alla prima rilevazione (2016) e alla rilevazione finale (2018) per singola categoria produttiva, con evidenza del consumo complessivo delle molecole considerate HPCIA.

**Figure 2:** AMU registered in 2016 and 2018 for sows, piglets, weaners and fatteners; HPCIA are highlighted.

Valutando le singole classi di antibiotico, quelle maggiormente rappresentate nei trattamenti per le scrofe e per i suinetti svezzati rimangono le aminopenicilline, anche se con un sensibile calo nelle quantità utilizzate (da 12.3 a 3.5 DDDAit nelle scrofe e da 38.8 a 25.7 DDDAit nei suinetti svezzati), mentre nei lattonzoli l'uso di aminopenicilline aumenta (da 5.3 a 10.4 DDDAit) diventando la classe più rappresentata in sostituzione delle cefalosporine. Negli ingrassi, le molecole più utilizzate nei trattamenti sono i sulfamidici sia nel 2016 che nel 2018, con un calo da 8.1 a 5.1 DDDAit. Esaminando nello specifico le molecole appartenenti alle classi degli HPCIA (Figura 3), le più importanti riduzioni si sono registrate per la colistina, completamente eliminata nelle scrofe, nei lattonzoli e negli ingrassi e ridotta sensibilmente nei suinetti svezzati (-98.7%) dove i consumi erano maggiormente rappresentati alla prima rilevazione. Considerando, invece, i consumi di cefalosporine di III e IV generazione, i lattonzoli rimangono la categoria produttiva in cui queste molecole vengono maggiormente somministrate, nonostante sia stata rilevata una diminuzione dei consumi del 50.4% nel 2018. Rispetto al 2016, inoltre, si è ridotto il consumo di macrolidi nelle scrofe, nei suinetti svezzati e negli ingrassi (rispettivamente - 92.4%, - 85.3% e - 96.6%), nonostante sia stato registrato un aumento dell'utilizzo di questa classe di antibiotici nei lattonzoli (+45.6%).

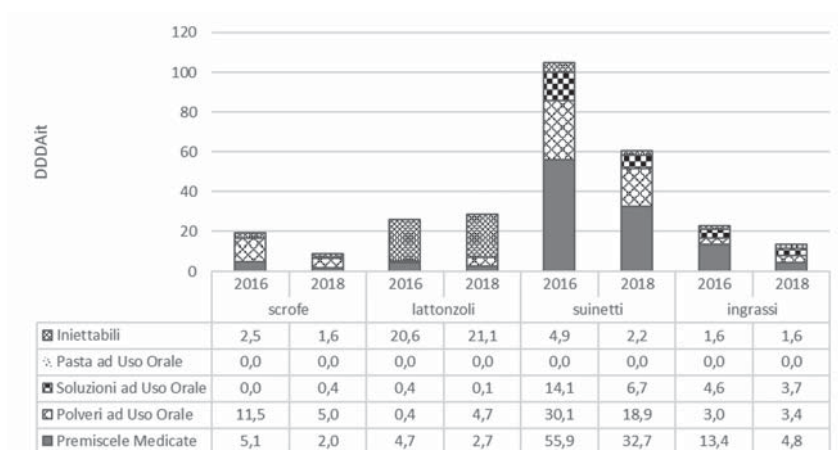




**Figura 3:** Confronto del consumo di antibiotici HPCIA suddiviso per classe di antibiotico nelle diverse categorie produttive.

**Figure 3:** Comparison between 2016 and 2018 consumption in all the HPCIA classes.

I consumi di antibiotico complessivo sono stati analizzati anche in funzione della via di somministrazione utilizzata: rispetto al 2016 è stata registrata una diminuzione della somministrazione attraverso premiscele in tutte le categorie produttive (scrofe - 61%, lattonzoli - 43%, suinetti svezzati - 41%, ingrassi -65%) e un lieve incremento dei prodotti somministrati per via parenterale nei lattonzoli (+ 3%), mentre sono aumentate le somministrazioni di prodotti in forma di polveri ad uso orale nei lattonzoli, precedentemente poco rilevate (da 0.4 a 4.7 DDDAit) (Figura 4).



**Figura 4:** distribuzione del consumo di antibiotico in funzione delle vie di somministrazione utilizzate nelle due rilevazioni (2016-2018).

**Figure 4:** route of administration of antimicrobials in 2016 and 2018.

## DISCUSSIONE

Complessivamente, i dati riportati mostrano una riduzione del consumo di antibiotico totale molto superiore al 20% prefissato in tutte le categorie produttive tranne nei lattonzoli, dove comunque la diminuzione dei prodotti HPCIA ha raggiunto il 50% del totale consumato nel 2016. Di notevole importanza la riduzione del consumo di antibiotico nella categoria dei suinetti svezzati: nonostante rimanga la categoria produttiva più rappresentata nei trattamenti antibiotici, la diminuzione è sostanziale sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, come dimostrato dal dato riguardante la colistina. Come già riportato nella presentazione dei dati preliminari del presente progetto nel 2019 (Pangallo *et al.*, 2019), le importanti scoperte in merito ai meccanismi di trasmissione delle resistenze alla colistina, hanno portato a limitazioni normative dell'uso in zootecnia di questa molecola "salvavita" per l'uomo, attraverso l'emanazione del DMS n.117/2016 e la nota del Ministero della Salute n. 18992 del 05/08/2016. Il carattere di urgenza che questi provvedimenti hanno avuto, giustificato dall'importanza dell'impatto che il problema ha sulla salute pubblica, si riflette anche sui risultati pubblicati da EMA (2019) in merito alle vendite di colistina in Italia nel 2017, che si attestano a valori prossimi a 5,2 mg/PCU, vicini al risultato prefissato per il 2020 nel PNCAR. A questo proposito, anche le linee guida per l'uso prudente dell'antibiotico nell'allevamento suinicolo indicano la colistina come molecola di terza scelta da utilizzare solamente quando le evidenze dimostrano l'inefficacia in vitro delle altre molecole disponibili. Questa variazione nel consumo di HPCIA nei suinetti svezzati evidenzia come, nel 2018, la categoria più a rischio per il consumo di antibiotico critico sia diventata quella dei lattonzoli. Infatti, nonostante la riduzione nel consumo di cefalosporine di III generazione, nei lattonzoli rimangono ancora alti sia i consumi di cefalosporine che quelli di macrolidi. Anche per questo aspetto si riprende quanto già riportato da Pangallo *et al.*, (2019) nella presentazione dei risultati preliminari, in merito all'impiego di queste molecole in trattamenti profilattici in corrispondenza della castrazione e del taglio coda o per la prevenzione delle forme cliniche legate ad infezioni da *Streptococcus* spp. Nel 2018, comunque, si è potuta osservare una riduzione nell'uso delle cefalosporine di III generazione nei lattonzoli a fronte di un maggior consumo di aminopenicilline, usate probabilmente in sostituzione alle molecole HPCIA come indicato nelle linee guida. Non è stato possibile verificare una ragione comune nel maggior impiego di macrolidi nella stessa classe produttiva. Il forte calo di consumo di cefalosporine sottoscrofa, associato alla riduzione fino a valori prossimi allo zero del consumo di colistina nei suinetti svezzati, è un risultato notevole nell'ottica di protezione verso le molecole "salvavita" per l'uomo. Una riflessione in prospettiva di miglioramenti nell'uso razionale dell'antibiotico riguarda le aminopenicilline, che sono le molecole più utilizzate negli allevamenti campionati in almeno 3 delle 4 categorie osservate, spesso somministrate attraverso la via orale. Secondo le più recenti indicazioni del Centro di riferimento per l'antibioticoresistenza (CRN-AR) dell'Istituto Zooprofilattico del Lazio e Toscana (IZSLT), le aminopenicilline (amoxicillina e ampicillina) non sono da considerarsi beta lattamici di prima linea in medicina veterinaria, infatti per la gran parte degli agenti patogeni nel suino (es: *S. suis* e *E. rhusiopathiae*, *Actinobacillus* spp., *Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp.) si possono considerare come beta-lattamici di prima linea le penicilline naturali (penicillina G per la somministrazione parenterale e penicillina V per l'uso orale). Questa considerazione è rilevante nel percorso di gestione prudente dell'antibiotico, poiché l'uso delle aminopenicilline, esercita pressione di selezione nei confronti di tutti i beta-lattamici, e favorisce l'emergenza e il mantenimento negli allevamenti anche delle resistenze alle cefalosporine a spettro esteso. Il dato positivo emerso dalla valutazione delle vie di somministrazione consente di evidenziare come la riduzione cospicua dell'antibiotico consumato abbia interessato maggiormente le premiscele,

nonostante l'impiego della via di somministrazione orale sia ancora molto rappresentato. La via di somministrazione orale è considerata quella con il maggior impatto sulla selezione delle resistenze nei microrganismi sia patogeni che commensali, quindi il maggior fattore di rischio di trasmissione di geni di resistenza tra batteri che condividono gli stessi habitat.

## **CONCLUSIONI**

Il progetto presentato, finanziato nell'ambito del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020, ha evidenziato come sia possibile, in assenza di investimenti strutturali o gestionali onerosi, ridurre e razionalizzare il consumo di antibiotico nell'allevamento suinicolo, attraverso la promozione di attività formative, informative e l'adozione di manuali di buone pratiche aziendali. Noto e notevole attenzione si pone al risultato relativo alle molecole HPCIA, considerate "salvavita" per l'uomo, rappresentato da importanti riduzioni del consumo di colistina e cefalosporine di III e IV generazione nelle prime fasi produttive. L'intervento normativo rappresentato dal DMS 177/2016, ha contribuito in maniera rilevante sui risultati del progetto, così come sui dati complessivi di utilizzo di colistina in ambito nazionale, offrendo buone speranze per il raggiungimento degli obiettivi fissati dal PNCAR (< 5 mg/PCU) per il 2020.

## **RINGRAZIAMENTI**

I dati presentati sono il risultato di quanto raccolto nell'ambito del progetto n. 5005479 (2106-2019) finanziato nell'ambito del Programma di Sviluppo Rurale 2014-2020 – misura 16.1.01-F2A della Regione Emilia Romagna. Si ringraziano sentitamente i veterinari, gli allevatori e il personale che ha partecipato alla realizzazione del progetto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico-Resistenza (CRN-AR): <http://www.izslt.it/crab/pillole-per-il-veterinario-pratico/>
2. Diegoli G, Granito G, Luppi A, Masera F, Merialdi G, Miraglia, V, Mussini P, Trevisi P, Trambajolo G (2018). Linee guida della Regione Emilia Romagna, Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino.
3. European Medicines Agency (EMA) - European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) (2019), Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2017, EMA/294674/2019.
4. Pangallo G, Bassi P, Motta V, Salvarani C, Luppi A, Merialdi G, Scali F, Alborali GL, Bosi P, Trevisi P (2019), Monitoraggio del consumo di antimicrobici negli allevamenti dell'Emilia Romagna nel periodo 2016-2017: dati preliminari.
5. Piano Nazionale di Contrasto all'Antimicrobico Resistenza (PNCAR) (2017). Ministero della Salute, Italia.
6. World Health Organization (WHO) (2019), Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision, Geneva (CH), ISBN 978-92-4-151552-8.



# EFFETTI DELLA GESTIONE AZIENDALE E DEL TAGLIO DELLA CODA SULL'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI IN AZIENDE SUINICOLE ITALIANE

## EFFECTS OF HUSBANDRY PRACTICES AND TAIL DOCKING ON ANTIMICROBIAL USAGE IN ITALIAN PIG FARMS

TARAKDJIAN J.<sup>1</sup>, CAPELLO K.<sup>1</sup>, PASQUALIN D.<sup>1</sup>, SANTINI A.<sup>1</sup>, CUNIAL G.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>2</sup>, MANNELLI A.<sup>3</sup>, TOMAO P.<sup>4</sup>, VONESCH N.<sup>4</sup>, DI MARTINO G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova, Italia

<sup>2</sup> Swivet Research, Reggio Emilia, Italia

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Torino, Italia

<sup>4</sup> Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro (INAIL), Monteporzio Catone, Roma, Italia

**Parole chiave:** Utilizzo di antibiotici, suini, taglio della coda

**Keywords:** Antimicrobial use, swine, tail docking

### RIASSUNTO

Il monitoraggio dell'utilizzo di antibiotici negli allevamenti può consentire la valutazione dei fattori di rischio maggiormente coinvolti e favorire politiche aziendali più responsabili. Tra il 2015 e il 2017 sono stati raccolti i dati di uso di farmaci antibiotici in 36 aziende suinicole da ingrasso. Tali dati sono stati poi espressi in dosi definite giornaliere italiane (DDDita) cui è stato applicato un fattore di correzione per popolazione (PCU). Al fine di esaminare l'effetto di fattori gestionali e strutturali sull'utilizzo di farmaci antibiotici, è stata condotta un'analisi retrospettiva. Nel complesso, i dati quantitativi registrati sono stati pari a 12 DDDita/PCU nel 2015 e a 8 DDDita/PCU nel 2017. Le dimensioni aziendali, diverse caratteristiche strutturali, il numero di addetti, la qualità dell'aria, la mortalità media e la presenza di animali non caudectomizzati non sono risultati associati alla quantità di farmaci antibiotici. Di contro, aziende appartenenti a circuiti welfare-friendly hanno mostrato livelli di utilizzo del 38% inferiori ( $P < 0,05$ ). In conclusione, la maggiore attenzione al benessere e l'abolizione del taglio della coda sono compatibili con un minore utilizzo del farmaco.

### ABSTRACT

Analysis of antimicrobial usage in livestock can allow for the identification of major risk factors, enhancing more responsible policies of usage. Antimicrobial treatments administered to 36 finishing pig farms in 2015–2017 were expressed as defined daily doses for Italian pigs (DDDita) per population correction unit (DDDita/PCU). A retrospective analysis was conducted to examine the effect of structural and management factors on antimicrobial usage. Overall, AMU ranged from 12 DDDita/PCU in 2015 to 8 DDDita/PCU in 2017. Farm size, some characteristics of the facilities, number of people employed in the farm, air quality, average mortality and presence of undocked pigs had no significant effects on AMU. Rather, farms addressed to welfare-friendly labels presented a 38% less usage ( $P < 0.05$ ). In conclusion, higher welfare standard and resigning tail docking are consistent with a lower usage.

### INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza rappresenta un serio pericolo per la salute umana e animale, poiché

alla diminuzione dell'efficacia dei principi attivi antibiotici consegue una notevole difficoltà nel trattamento delle affezioni ad eziologia batterica (EFSA, ECDC, 2019). Fattori quali un sovra-utilizzo o un utilizzo incoerente dei farmaci contribuiscono alla selezione di ceppi resistenti. Di fatto, microrganismi esposti a concentrazioni sub-terapeutiche di antibiotici possono esprimere meccanismi di resistenza come risposta adattativa. L'ampio utilizzo dei mangimi medicati può, inoltre, far sì che taluni soggetti ricevano dosi non sufficienti di farmaco nel caso in cui questi presentino una alterazione dell'appetito.

Il report congiunto pubblicato da EMA, EFSA e ECDC nel 2017 sul monitoraggio dell'uso degli antibiotici in Europa ha inserito l'Italia al terzo posto, preceduta dall'Isola di Cipro e dalla Spagna, per quantitativi di farmaci somministrati agli animali destinati alla produzione di alimenti (ECDC, EFSA, EMA, 2017). Per promuovere un utilizzo consapevole degli antibiotici, l'OMS ha deciso di ripartire tutti i principi attivi antibatterici in diverse classi a seconda dell'importanza che tali sostanze rivestono in medicina umana: antimicrobici di importanza critica (*critically important antimicrobials* o CIA - a loro volta suddivisi in CIA a priorità elevata H-CIA e a priorità altissima HP-CIA), antimicrobici di importanza elevata (HIA) e antimicrobici importanti (IA). La ripartizione è stata condotta sulla base della disponibilità in medicina umana di terapie alternative e della frequenza d'uso delle diverse classi (WHO, 2019). A sua volta, l'EMA ha delineato un metodo standardizzato *dose-based* per la quantificazione dell'utilizzo di tali farmaci (EMA, 2016).

Studi precedenti in diversi stati membri hanno sottolineato come specifici interventi inerenti la biosicurezza e la gestione delle problematiche di salute degli animali siano associati a riduzione del consumo di antibiotici. Di contro, le nuove sfide del benessere animale quali l'abolizione del taglio della coda potrebbero determinare un aumento del consumo di antibiotici per via delle lesioni conseguenti alla morsicatura della coda che rappresenta uno dei principali problemi nell'allevamento suino. Possono infatti conseguirne infezioni secondarie, riduzione della performance, aumento della mortalità e deprezzamento delle carcasse. Ad oggi sono presenti pochi dati riguardanti l'utilizzo di antibiotici nel settore suinicolo in particolare in relazione a diversi spetti gestionali, pertanto il presente lavoro riporta quanto riscontrato in un campione casuale di aziende del Nord Italia (con particolare riferimento agli HP-CIA) e analizza le possibili associazioni con alcuni fattori di rischio.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione delle aziende e raccolta dati*

Tra il 2015 e il 2017 sono state ispezionate 36 aziende da ingrasso del Nord Italia, con numerosità comprese tra i 900 e i 10000 animali ospitati. Sono stati raccolti i dati relativi a: numero di animali macellati ogni anno, trattamenti antimicrobici effettuati, numero di addetti impiegati in allevamento, mortalità media (calcolata sulla base della differenza tra il numero di animali in ingresso e in uscita annui), presenza di parchetto esterno, tipo di filiera (filiera welfare-friendly o convenzionale), presenza di animali non caudectomizzati. In base alla distribuzione dei dati, le aziende sono state suddivise in due gruppi a seconda che il numero di animali per ciclo di ingrasso fosse inferiore o superiore a 2000 unità. Nell'arco di ogni visita sono stati misurati i livelli di ammoniaca all'interno dei capannoni tramite rilevatore multigas Dräger X-am 7000 (Dräger Safety AG & Co. KGaA, Lubeca, Germania).

### *Analisi dati*

I milligrammi di principi attivi sono stati convertiti in DDDita sulla base delle dosi massime somministrabili dei prodotti commerciali italiani e rapportati alle unità di correzione di popolazione (PCU). Per calcolare la PCU è stato moltiplicato il numero di animali trattabili, ricavato dall'estrazione delle movimentazioni animali in anagrafe nazionale, per il peso me-

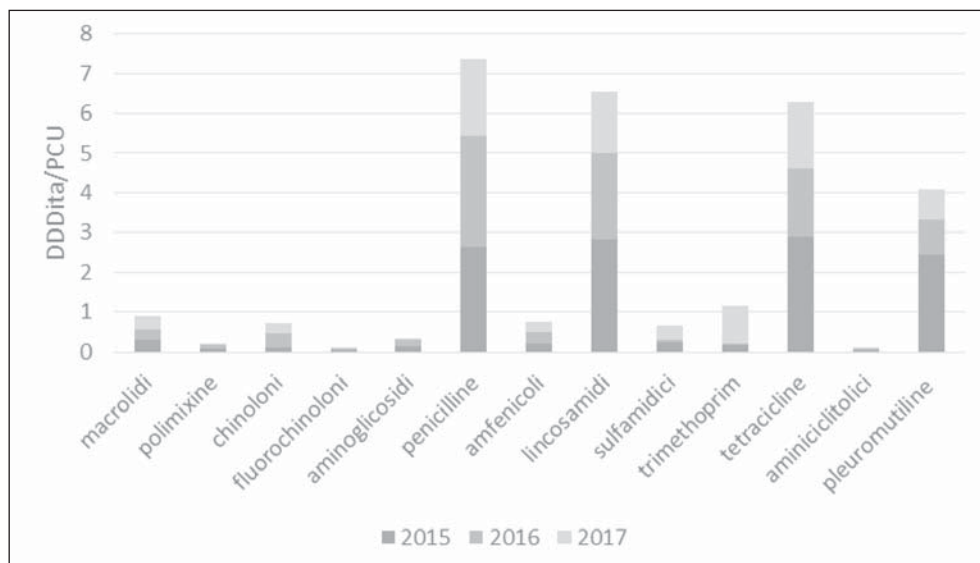
dio al trattamento, scelto di 100 kg in accordo con Pangallo et al., 2019. I diversi antibiotici sono stati suddivisi in base alla loro importanza critica per la salute umana (WHO, 2019). Per l'analisi statistica è stato applicato il test di Friedman per valutare la distribuzione dei valori di DDDita nel corso dei tre anni considerati. Per verificare la presenza di una possibile associazione tra l'utilizzo di antibiotici e i fattori considerati nella raccolta dati, per ciascuna azienda è stato calcolato un valore mediano di DDDita. Infine, dopo aver valutato l'omogeneità delle varianze mediante il test statistico di Levene, è stato applicato il test di Mann-Whitney per testare la potenziale significatività delle associazioni. L'analisi dei dati è stata condotta utilizzando il software STATA v.12.1.3.

## RISULTATI

In Figura 1 sono riportati i valori delle DDDita/PCU somministrate tra il 2015 e il 2017 in 36 aziende da ingrasso. I valori di HP-CIA riscontrati costituiscono tra il 4% e il 9% dell'utilizzo totale di farmaco registrato nell'arco dei tre anni considerati. Le classi antibiotiche più impiegate sono state tetracicline, lincosamidi e penicilline, con valori percentuali compresi tra il 63% e il 70% del totale nei tre anni. Fattori quali le dimensioni aziendali, il numero di addetti, la qualità dell'aria, la mortalità media e la presenza di animali con coda intera non hanno prodotto un effetto statisticamente significativo sull'utilizzo di antimicrobici. Al contrario, le aziende all'interno di filiere Welfare-friendly presentavano un utilizzo del 38% inferiore rispetto alle filiere convenzionali ( $P < 0,05$ ).

**Figura 1:** dosi (n. DDDita/PCU) somministrate tra il 2015 e il 2017 in 36 aziende da ingrasso italiane

**Figure 1:** doses (n. DDDita/PCU) administered in 2015-2017 in 36 Italian finishing farms



## DISCUSSIONE

La quantificazione dell'utilizzo di antibiotici rappresenta attualmente un tema di grande interesse nell'allevamento di animali destinati alla produzione alimentare. Nonostante ciò, la maggior parte degli studi ad oggi pubblicati si focalizza principalmente su quali siano le classi maggiormente impiegate (EFSA, ECDC, 2019) più che sui fattori di rischio associati



Nell'allevamento del pollame, che a differenza di quello suinicolo è strettamente integrato, è stato rilevato un trend di utilizzo decrescente tra il 2015 e il 2018, motivato da specifiche azioni intraprese dalle filiere a tutti i livelli della catena produttiva (Caucci et al., 2019).

Nel settore suinicolo i farmaci antibiotici sono somministrati principalmente tramite mangimi medicati o acqua di abbeverata, mentre i trattamenti individuali sono rari. Pertanto, un programma finalizzato alla riduzione dell'utilizzo di antimicrobici dovrebbe includere la formazione specifica dei veterinari per promuovere interventi più mirati, nonché una maggiore consapevolezza da parte degli allevatori stessi. Proprio questi ultimi, in un recente studio italiano, hanno mostrato una scarsa presa di coscienza della propria responsabilità diretta e indicano la medicina umana come principale causa di aumento della resistenza ai farmaci piuttosto che le somministrazioni a livello zootecnico (Di Martino et al., 2018). Inoltre è auspicabile un miglioramento delle prassi gestionali e delle misure di biosicurezza, in grado di ridurre l'utilizzo di farmaci antibiotici.

Un precedente studio italiano con il medesimo approccio dose-based (Pangallo et al., 2019) ha individuato nella fase di finissaggio un tasso di riduzione doppio rispetto a quello riportato nel presente lavoro, con una diminuzione del 16,3% e del 45,8% dell'utilizzo totale di antimicrobici e di HP-CIA, rispettivamente, dal 2016 al 2017. La percentuale di HP-CIA registrata nel 2017 dai suddetti autori è tuttavia risultata leggermente superiore rispetto al campione qui analizzato (11% vs 9% del totale). Tra il 2015 e il 2017 le penicilline, tetracicline e lincosamidi, che hanno costituito rispettivamente il 23,7%, 20,2% e il 18,8% della massa totale di antibiotici somministrati all'interno delle aziende coinvolte, sono state le classi più utilizzate. Questi principi attivi sono generalmente utilizzati per il trattamento delle affezioni respiratorie nei suini all'ingrasso, mentre i lincosamidi sono spesso impiegati in caso di patologie sostenute da *Brachyspira hyodysenteriae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Lawsonia intracellularis*.

Le dimensioni aziendali non hanno dimostrato un effetto significativo sull'utilizzo di antibiotici. In letteratura, altri studi che hanno analizzato il ruolo di tale fattore sono giunti a conclusioni discordanti. Vieira et al. (2010) affermano che aziende con un numero di animali macellati compreso tra le 200 e le 1000 unità/anno tendono ad utilizzare un quantitativo superiore di farmaco rispetto ad aziende di dimensioni maggiori, probabilmente a causa di condizioni igieniche più scarse, se paragonate ad aziende meglio organizzate. Di contro, altri autori sottolineano come aziende con numeri di animali più consistenti siano associati ad un utilizzo più marcato del farmaco per le maggiori probabilità di diffusione delle malattie (Hemme et al., 2018). Infine, uno studio condotto in Giappone su 72 aziende suinicole a ciclo chiuso ha ricercato una potenziale correlazione tra l'utilizzo di farmaci e le dimensioni aziendali senza però riscontrare alcun nesso con questa caratteristica (Lei et al., 2019).

Aziende appartenenti ad una filiera welfare-friendly hanno manifestato un tasso di utilizzo inferiore. Questo tipo di filiera è caratterizzato da un supporto tecnico-scientifico costante agli allevatori da parte dei veterinari, frequenti programmi di formazione del personale inerenti le tematiche di biosicurezza e buone pratiche di gestione, presenza continua di paglia e di arricchimenti ambientali nei recinti (tronchetto e catene), monitoraggio e sanificazione costanti dei sistemi di abbeverata, oltre che piani specifici per l'abbandono graduale delle amputazioni preventive.

Una ulteriore recente sfida della suinicoltura è l'allevamento di suini non caudectomizzati, con il conseguente aumento del rischio di problematiche sanitarie e infezioni che potrebbero aumentare l'utilizzo di farmaci. Il mancato ritrovamento di tale associazione nell'arco del presente studio potrebbe supportare la sostenibilità dell'allevamento di suini con coda integra.

Elevate concentrazioni di ammoniaca nell'aria potrebbero avere gravi effetti sulla salute delle vie aeree superiori degli animali. Per tale motivo, patologie del tratto respiratorio potrebbero essere associate ad una scarsa qualità dell'aria e, di conseguenza, a somministrazioni più frequenti di antibiotici. È anche vero che altri studi hanno invece rilevato come l'ammoniaca sia limitatamente collegata alla presenza di lesioni macroscopiche e alterazioni patologiche supportando la mancanza di associazione rinvenuta in questo studio.

## CONCLUSIONI

Questo studio ha fornito dati di utilizzo di antibiotici in un campione casuale di aziende, senza evidenziare una diminuzione d'uso degli HP-CIA. Inoltre, aziende appartenenti a circuiti welfare-friendly hanno mostrato livelli di utilizzo inferiori, mentre l'abolizione del taglio della coda non ha implicato un utilizzo più elevato.

## RINGRAZIAMENTI

I dati riportati sono stati raccolti nell'ambito del progetto n. D22F17000070001 finanziato da INAIL.

## BIBLIOGRAFIA

1. Caucci, C., Di Martino, G., Dalla Costa, A., Santagiuliana, M., Lorenzetto, M., Capello, K., Mughini-Gras, L., Gavazzi, L., Bonfanti, L. (2019). Trends and correlates of antimicrobial use in broiler and turkey farms: a poultry company registry-based study in Italy. *J. Antimicrob. Chemoth.* 74, 2784–2787
2. Di Martino, G., Crovato, S., Pinto, A., Dorotea, T., Mascarello, G., Brunetta, R., Agnoletti, F., Bonfanti, L. (2018). Farmers' attitudes towards antimicrobial use and awareness of antimicrobial resistance: a comparative study among turkey and rabbit farmers. *Ital. J. Anim. Sci.*, 18, 194-201
3. ECDC, EFSA, EMA. (2017). Second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA J.*, 15 (7)
4. EFSA, ECDC. (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicators bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA J.* 17(2):5598
5. EU Council Directive 2008/120/EC of 18 December 2008 laying down minimum standards for the protection of pigs (Codified version). Available at: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32008L0120:en:NOT>>
6. European Medicines Agency (EMA). (2015). Principles on Assignment of Defined Daily Dose for animals (DDDvet) and Defined Course Dose for Animals (DCDvet). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/principles-assignment-defined-daily-dose-animals-dddvet-defined-course-dose-animals-dcdvet\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/principles-assignment-defined-daily-dose-animals-dddvet-defined-course-dose-animals-dcdvet_en.pdf)
7. European Medicines Agency (EMA). (2016). Defined daily doses for animals (DDDvet) and defined course doses for animals (DCDvet)
8. European Medicines Agency (EMA). (2019) Sales of veterinary antimicrobial agents in Europe in 31 European Countries in 2017. [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2017_en.pdf)
9. Hemme, M., Ruddat, I., Hartmann, M., Werner, N., Van Rennings, L., Kasböhner, A., Kreienbrock, L. (2018). Antibiotic use on German pig farms—A longitudinal analysis for 2011, 2013 and 2014. *PLOS One*, 13
10. Lei, Z., Takagi, H., Yamane, I., Yamazaki, Naito, M., Kure, K., Sugiura, K. (2019). Antimicrobial usage on 72 farrow-to-finish pig farms in Japan from 2015 to 2017. *Prev. Vet. Med.*, 173, 104802

11. Pangallo, G., Bassi, P., Motta, V., Salvarani, C., Luppi, A., Merialdi, G., Scali, F., Alborali, G.L., Bosi, P., Trevisi, P. (2019). Monitoring antimicrobial use in Emilia Romagna region herds during 2016-2017: preliminary results. 45th SIPAS conference. Rezzato (BS), Villa Fenaroli, 21-22 Marzo 2019, 77-84
12. Piano di azione nazionale per il miglioramento dell'applicazione del Decreto Legislativo 122/2011. 2018. <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2019&codLeg=68064&parte=1%20&serie=null>
13. Vieira, A., Pires, S., Houe, H., Emborg, H. (2010). Trends in slaughter pig production and antimicrobial consumption in Danish slaughter pig herds, 2002–2008. *Epidemiol. Infec.* 139, 1601-1609
14. World Health Organization (WHO). (2019). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine – 6th Revision. Geneva: WHO

# VALUTAZIONE DELLE LESIONI NEI SUINETTI IN LATTAGIONE: EFFETTO DEL TAGLIO DELLA CODA, DELL'ETÀ E DELLE CONDIZIONI DI ALLEVAMENTO

## LESION ASSESMENT IN SUCKLING PIGLETS: EFFECTS OF TAIL-DOCKING, AGE AND HOUSING

VITALI M., SANTACROCE E., CORREA F., SALVARANI C., PADALINO B., TREVISI P.

*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari - DISTAL, Università di Bologna*

**Parole chiave:** Benessere animale, suini, morsicatura code, lesioni, salute

**Key words:** Animal Welfare, swine, tail biting

### RIASSUNTO

Le lesioni della cute e della coda nei suini pongono criticità per il benessere animale in tutte le fasi di allevamento. Le lesioni derivano da comportamenti aggressivi e/o in risposta a condizioni stressanti, a causa di pratiche di allevamento inadeguate. Conoscere i fattori predisponenti è fondamentale per ridurre la prevalenza delle lesioni. I fattori di rischio possono essere specifici per ciascuna fase di allevamento, tuttavia pochi studi si sono occupati della fase sottoscrofa. Lo studio indaga la frequenza e la tipologia di lesioni e altri parametri sanitari nei suinetti sottoscrofa e sui fattori di allevamento relazionati ad esse. Sono state considerate 136 nidiata di suinetti a coda integra (55) e tagliata (79), provenienti da due allevamenti italiani. I parametri sono stati raccolti in due stagioni (inverno e estate) e a due età (7 e 20 giorni). I parametri rilevati erano: misure ambientali e di management (6 parametri); lesioni e parametri sanitari (12 parametri). Per la statistica è stato utilizzato un modello generale lineare misto. Le principali problematiche di benessere hanno riguardato la presenza di lesioni nel quarto anteriore, alle orecchie, alla coda, lesioni carpal e un basso body condition score. Le condizioni di allevamento e ambientali, in particolare la somministrazione di latte supplementare, la dimensione delle nidiata, la temperatura ambientale e del nido sono stati i fattori positivamente associati con la prevalenza delle lesioni osservate.

### ABSTRACT

Skin and tail lesions have been considered animal-based indicators of poor animal welfare in pigs at any age. Those lesions may be caused by aggressive behaviors, stressful rearing conditions and poor housing conditions. Enhancing the knowledge of risk factors for lesions outcomes represents a key strategy to reduce their occurrence. Risk factors are specific to any rearing phase, however few are known about the nursery phase. The present study investigates types and frequency of lesions and health parameters in suckling piglets, and how housing conditions may influence them. A total of 136 litters composed by undocked and tail-docked piglets were assessed at two farms. Data were collected in two seasons (winter and summer) and at two ages (7d and 20d). Recorded parameters included: environment and management (6 parameters); lesions and health (12 parameters). Statistical analysis were carried out using a general linear mixed model. Skin lesions were predominantly distributed on upper-body (facial and neck), ear and tail areas. Other issues were, carpal lesions and in low body condition score. Housing condition such as milk supplementation, litter size and environment and nest temperature were the main factors influencing lesion outcomes.

## INTRODUZIONE

Le lesioni cutanee e della coda sono tra le principali problematiche di benessere nel suino (Klaaborg et al., 2019; Peden et al., 2018). Esse sono spesso conseguenza di comportamenti aggressivi o anomali che si verificano nel gruppo di suini (Skock et al., 2014). La loro insorgenza ha origine multifattoriale e deriva da condizioni di allevamento inadeguate (Jhonson e Marchant-Frode, 2008). Le lesioni possono avvenire in ogni fase del ciclo produttivo, tuttavia ci sono pochi studi riguardanti la loro presenza in suinetti sottoscrofa. La maggior parte degli studi si focalizza sulla fase di post-svezzamento, dove vi è la maggiore prevalenza di lesioni e di comportamenti aggressivi (Ursinus et al., 2014). Poiché i comportamenti aggressivi si possono manifestare già dalla prima settimana di vita e influenzare le fasi seguenti, è crescente l'interesse per lo studio della fase sottoscrofa (Telkänranta e Edwards, 2018) in particolare degli effetti che le diverse pratiche di allevamento, tra cui il taglio della coda, possono avere su lesioni, salute e benessere dei suinetti in questa fase. Il taglio della coda è una pratica introdotta come misura "preventiva" per ridurre le lesioni da morsicatura della coda nell'allevamento suinicolo (Nalon, 2019). Ad oggi tuttavia questo metodo è considerato inefficace nell'eliminazione delle lesioni alla coda; e altre strategie sono state sviluppate per prevenirle, con lo scopo di migliorare il benessere degli animali allevati (Pandolfi et al., 2017; Wallgren et al., 2019). Migliorando le condizioni di benessere, la presenza di lesioni alla coda risulta minima anche con code non tagliate (Nannoni et al., 2016). Alla luce di queste evidenze scientifiche, la Dir. 120/2008 CE vieta il taglio della coda come pratica routinaria, nonostante venga ancora praticato in gran parte degli Stati Membri dell'UE (Nalon, 2019). Quali siano i fattori che influenzano il verificarsi di lesioni cutanee e alla coda è tutt'ora oggetto di studio, ed è fondamentale per definire strategie preventive efficaci. Diversi fattori sono stati collegati alla presenza di lesioni nei suinetti sotto scrofa tra i quali: dimensione della nidiata, specialmente quando sono utilizzate scrofe iperprolifiche (Kobek-Kjeldager et al., 2019), e competizione per le mammelle, a seguito di erronei sistemi di pareggiamento. Questi fattori sono stati correlati ad una maggiore prevalenza di lesioni facciali e alle orecchie nei suinetti sottoscrofa, già ad una settimana di età (Skok e Škorjanc, 2013, Skok et al., 2014, Peden et al., 2018). Parametri ambientali come stagione (Muns et al., 2016), temperatura (Vasdal et al., 2009) e luminosità (Lachance et al., 2010; Simitzis et al., 2013) potrebbero anch'essi influenzare il comportamento dei suinetti sottoscrofa, anche se la loro relazione con la presenza di lesioni non è ancora chiara. Questo studio ha come primo obiettivo quello di valutare i principali problemi di benessere, in suinetti sottoscrofa allevati in due aziende italiane, utilizzando parametri *animal-based* e ambientali. In secondo luogo, si propone di investigare le associazioni tra i parametri di salute, lesioni e diversi fattori quali taglio della coda, età dei suinetti, stagione e condizioni di allevamento.

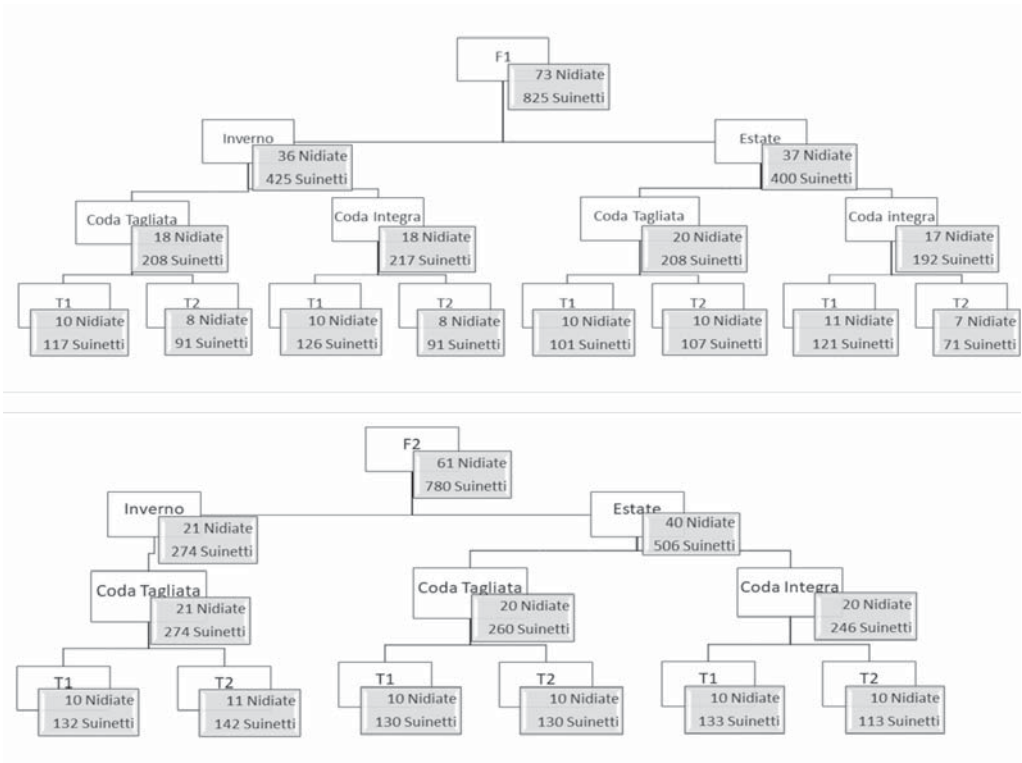
## MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 136 nidiata di circa 13 suinetti ciascuna ( $\pm 1,74$ ), allevate in due allevamenti intensivi italiani: allevamento 1 (F1, 75 nidiata) e allevamento 2 (F2, 61 nidiata); i quali utilizzavano gabbie parto tradizionali con pavimento fessurato in plastica e il nido caldo a pavimento pieno su un angolo della gabbia. Entrambi gli allevamenti utilizzavano scrofe iperprolifiche e fornivano latte supplementare ai suinetti a partire dal terzo giorno di vita. F1 forniva latte ad libitum in un abbeveratoio specifico, tramite un distributore automatico, mentre F2 lo distribuiva manualmente due volte al giorno in una mangiatoia circolare. Le nidiata sono state scelte casualmente in entrambe le aziende (Welfare Quality®, 2009). La raccolta dati è stata eseguita, in entrambe le aziende, durante due stagioni: inverno (I = febbraio-marzo 2019) ed estate (E = luglio- settembre 2019). In F1, erano pre-

senti, in entrambe le stagioni, sia suinetti a coda tagliata (CT) che a coda integra (CI). F2 era costituito da suinetti con CT in inverno, mentre da suinetti CI e CT in estate. I parametri di benessere sono stati raccolti, a 7 giorni dalla nascita (T1) e prima dello svezzamento, il giorno 20 (T2); per un totale di 14 rilievi (Fig 1).

**Fig 1. Schema delle osservazioni.** Lo studio ha coinvolto due aziende, per un totale di 134 nidiatae (1505 suinetti). Ogni allevamento è stato osservato in inverno e estate. Le osservazioni sono state fatte in due momenti: a 7 giorni di vita (T1) e a 20 giorni di vita (T2, prima dello svezzamento). In ogni allevamento c'erano sia nidiatae di suinetti a coda tagliata (entro la prima settimana di vita) che a coda integra.

**Fig 1. Scheme of observations.** In the study, a total of 134 litters (1505 piglets) were assessed in two farms. Each farm was assessed both in winter and summer. Observations were performed at 7d of life (T1) and at 20d of life (T2, just before weaning). Each farm raised some litters with intact tails and other whose piglets received tail docking within the first week of life.



I parametri di benessere sono stati modificati dai protocolli Welfare Quality® (2009), Classyfarm (www.classyfarm.it) e AssureWel (www.assurewel.org), come riportato in Tab 1.

**Tab 1.** Lista dei parametri misurati, unità studio e bibliografia.

MA=misure ambientali, LS=lesioni e parametri sanitari.

**Tab 1.** List of parameters measured in the study, level of sampling and references.

MA=Housing measures; LS=lesion and health measures.

| Tipo | Parametro                             | Unità     | Bibliografia                      |
|------|---------------------------------------|-----------|-----------------------------------|
| MA   | Capezzoli/suinetti                    | Nidiata   | -                                 |
| MA   | Temperatura nido                      | Nidiata   | -                                 |
| MA   | Temperatura gabbia parto              | Nidiata   | -                                 |
| MA   | Luce                                  | Nidiata   | Dir 120/2008 CE                   |
| MA   | Densità                               | Nidiata   | Classyfarm/ Dir 120/2008 CE       |
| MA   | Materiali manipolabili                | Nidiata   | Racc 336/2016 CE                  |
| LS   | Lesioni cutanee                       | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Lesioni alla coda                     | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Lacrimazione ( <i>tear staining</i> ) | Individuo | Telkharanta et al. 2016           |
| LS   | Body condition score (BCS)            | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Diarrea                               | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Disturbi neurologici                  | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Ernia                                 | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Lesioni carpali                       | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Zoppie                                | Individuo | Welfare Quality® Protocol for Pig |
| LS   | Ulteriori cure                        | Individuo | AssureWel®                        |

I parametri erano divisi in misure di lesioni e salute (LS) e misure ambientali (MA). LS erano valutati dallo stesso operatore, dentro la gabbia parto ad una distanza di circa 0.5 m dal suinetto. Le lesioni cutanee e della coda sono state valutate utilizzando una scala 0-2 (0 = assenza, 1 = lieve, 2 = grave). La prevalenza di ciascuna classe di gravità per ciascuna area del corpo è stata calcolata in ogni nidiata. Per i parametri LS con punteggio SI/NO, è stata calcolata la prevalenza del verificarsi di questo segno clinico (SI) in ogni nidiata. Un valore di prevalenza  $\geq 10\%$  è stato considerato come un problema di benessere, mentre valori compresi tra 5-10%, come avvertimenti (Welfare Quality, 2009). MA erano rilevati da persone diverse sotto la supervisione di un esperto valutatore. Luce e temperatura erano campionati all'altezza della testa dei suinetti considerando tre punti diversi della gabbia: l'angolo interno vicino al corridoio centrale, al centro della gabbia parto e all'angolo opposto al primo, vicino alla parete esterna. Per calcolare la densità, è stato utilizzato Extech DT40M: Laser Distance Meter (Nashua, New Hampshire, USA) e il valore è stato diviso per il numero di suinetti nella nidiata. La luminosità è stata valutata utilizzando un luxometro portatile UNI-T UT383 (Dongguan City, Cina); la temperatura è stata misurata utilizzando il termometro UNI-T UT330C USB (Dongguan City, Cina).

Le analisi statistiche sono state eseguite con R (R Core Team, 2017). L'unità statistica era la nidiata e la significatività statistica era  $P \leq 0,05$ ; Le analisi descrittive sono state eseguite uti-



lizzando il pacchetto `psyc.ir` (R Core Team, 2017). Per valutare se i parametri MA, la stagione e il taglio della coda hanno avuto un effetto su LS, è stata fatta un'analisi GLM utilizzando il pacchetto `Stats` (R Core Team, 2017).

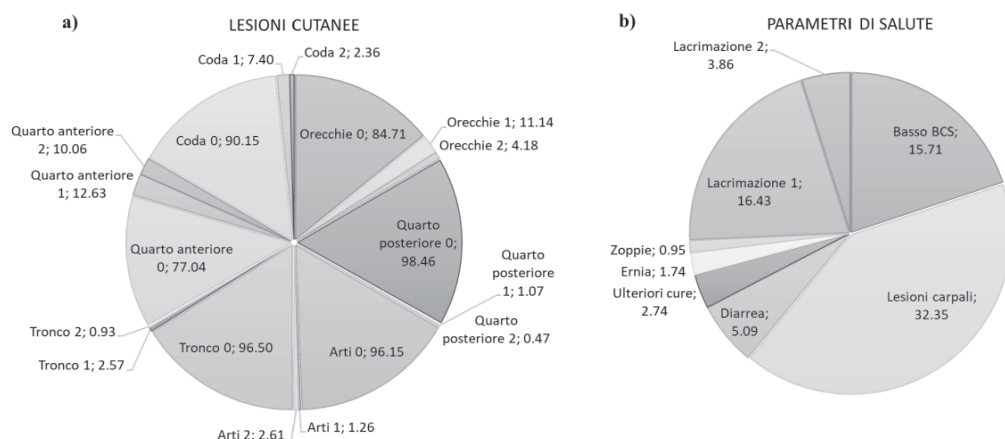
## RISULTATI

I parametri MA hanno dimostrato che la luminosità era spesso inferiore ai 40 lux indicati nella Dir 120/2008 CE (media di tutti i rilievi: 19,97 lux). La densità era superiore a quanto raccomandato dalla stessa direttiva (0,32 m<sup>2</sup>/capo). La temperatura media della gabbia parto, era di 22.64°C, mentre quella media del nido era di 28.96°C. Entrambi gli allevamenti non disponevano di materiale manipolabile per i suinetti.

La procedura GLM ha verificato se le MA presentassero differenze tra allevamento, età, stagioni e taglio della coda. La differenza è stata osservata nella dimensione della nidiata, la quale era significativamente più alta ( $P = 0,04$ ) in F2 ( $12,84 \pm 1,79$  suinetti) rispetto a F1 ( $11,30 \pm 1,66$ ), in I ( $12,32 \pm 1,63$ ) rispetto a E ( $11,77 \pm 2,03$ ;  $P = 0,03$ ) e inferiore ( $P = 0,009$ ) in T2 ( $11,64 \pm 1,80$ ) rispetto a T1 ( $12,33 \pm 1,90$ ). Gli altri MA non erano influenzati dall'allevamento, dalla coda o dall'età dei suinetti. Pertanto, tutti gli MA (esclusa la dimensione della nidiata) sono stati inclusi nel modello GLM per valutare il loro effetto sui parametri LS. I parametri LS aventi una prevalenza  $> 10\%$ , sono risultati: lesioni all'orecchio (15,32%), lesioni al quarto anteriore (22,69%), basso BCS (15,71%) e lesioni agli arti (32,35%). LS compresi tra 5-10% costituenti avvertimenti, sono risultati: lesioni della coda (9,76%) e diarrea (5,09%). La distribuzione di tutti gli LS e i punteggi sono mostrati in Fig 2.

**Fig 2. Media della prevalenza delle lesioni cutanee (a) e altri parametri di salute (b) riscontrati nel totale delle nidiatae.** a) La sfumatura cromatica si riferisce alla gravità di lesione dove 0 (grigio più chiaro) indica l'assenza e 2 (grigio più scuro) lesioni gravi. Per ciascuna classe di lesione è riportata la prevalenza (%). b) La legenda include la prevalenza media del manifestarsi del parametro.

**Fig 2. Mean of prevalence of observed skin lesions (a) and other health measures (b) considering all the litters assessed.** a) Color gradient are referred to the severity of the lesion where 0 (lighter grey) is for absence and 2 (darker grey) are severe lesions. In each class of lesion, the mean of the prevalence was reported (%). b) Legend includes the average of prevalence (%) of the parameter.



L'allevamento di provenienza è stato il fattore che ha influenzato maggiormente le lesioni nelle seguenti aree: quarto anteriore, orecchie, coda e arti. In queste aree la prevalenza era più alta in F2 rispetto a F1. Considerando le classi di gravità, in F2 vi era una maggiore prevalenza di lesioni gravi alla coda ( $3,35 \pm 5,02$ ) rispetto a F1 ( $1,68 \pm 4,33$ ) ( $P = 0,02$ ). Le lesioni lievi all'orecchio erano significativamente più alte in F2 ( $15,5 \pm 14,87$ ) rispetto a F1 ( $4,78 \pm 8,79$ ) ( $P = 0,03$ ). Le lesioni gravi al quarto anteriore sono risultate più alte in F2 ( $16,36 \pm 13,37$ ) rispetto a F1 ( $5,02 \pm 8,04$ ) ( $P = 0,01$ ). Anche le lesioni gravi agli arti erano significativamente influenzate dall'allevamento, con una prevalenza maggiore in F2 ( $2,84 \pm 6,15$ ) rispetto a F1 ( $2,42 \pm 5,21$ ) ( $P = 0,04$ ).

Se consideriamo invece l'età dei suinetti, la prevalenza dei parametri LS cresce all'aumentare dell'età dei suinetti. In particolare, è significativa la prevalenza di lesioni lievi al quarto anteriore e alla coda ( $P = 0,009$  e  $P = 0,0007$  rispettivamente) che aumentano al T2 ( $16,45 \pm 15,04$ ;  $11,85 \pm 12,08$ ) rispetto al T1 ( $9,04 \pm 10,88$ ;  $2,98 \pm 5,04$ ). Sono state riscontrate maggiori lesioni lievi nel tronco e nel quarto posteriore al T2 ( $4,69 \pm 8,38$ ;  $2,02 \pm 4,51$ ) rispetto al T1 ( $0,57 \pm 2,07$ ;  $0,19 \pm 1,13$ ). La presenza di abbondante lacrimazione era correlata all'età dei suinetti ( $P = 0,04$ ), mostrando una maggiore prevalenza al T2 ( $5,21 \pm 8,26$ ) rispetto al T1 ( $2,23 \pm 5,74$ ).

La stagione è risultata influenzare ( $P = 0,05$ ) le lesioni agli arti, con prevalenze maggiori in I ( $2,85 \pm 5,48$ ) rispetto a E ( $0,23 \pm 1,40$ ) per le lesioni di lieve entità, analogamente a quanto è risultato per le lesioni gravi ( $P = 0,02$ , prevalenza  $3,63 \pm 6,64$  in I e  $1,85 \pm 4,66$  in E). Anche la lacrimazione (lieve) è risultata maggiormente presente in I ( $28,95 \pm 17,93$ ), rispetto a E ( $6,71 \pm 9,93$ ;  $P = 0,0002$ ), così come la presenza di diarrea ( $6,33 \pm 13,02$  I vs  $4,39 \pm 12,71$  E;  $P = 0,05$ ).

Il taglio della coda non ha influenzato nessuno dei parametri testati, ad eccezione delle lesioni gravi alla coda ( $P = 0,01$ ), maggiori in CT ( $2,49 \pm 4,60$ ) rispetto a CI ( $2,36 \pm 4,92$ ). La temperatura nella gabbia parto era direttamente proporzionale alla prevalenza di lesioni alla coda ( $P = 0,01$ ) e alla presenza di suinetti che necessitavano di ulteriori cure ( $P = 0,02$ ); nonché inversamente proporzionale alla prevalenza di suinetti con basso BCS ( $P = 0,004$ ) e con lesioni agli arti ( $P = 0,03$ ). La diarrea si è rivelata inversamente proporzionale alla temperatura del nido ( $P = 0,04$ ). La luminosità era direttamente proporzionale alla prevalenza di suinetti che avrebbero beneficiato di ulteriori cure ( $P = 0,005$ ), mentre il numero di capezzoli/suinetto è risultato inversamente proporzionale alla prevalenza delle zoppie ( $P = 0,01$ ).

## DISCUSSIONE

Dai risultati si evidenzia che, già nella fase sottoscrofa, vi è la presenza di lesioni, confermando la necessità di indagare maggiormente sulle problematiche di benessere già in questa fase di allevamento. Entrambi gli allevamenti presentavano non conformità rispetto alla normativa europea per quanto riguarda la luminosità (inferiore ai 40 lux) e la presenza di materiali manipolabili (marginali in F1 e assenti in F2). I parametri problematici per il benessere dei suinetti hanno riguardato la presenza di lesioni sulla parte anteriore del corpo (testa, orecchie, quarto anteriore), un basso BCS, la presenza di lesioni carpal e agli arti. In questa fase si è rilevata anche la presenza di lesioni alla coda; a conferma che strategie preventive dovrebbero essere messe in atto già a partire da questa fase.

I risultati hanno dimostrato che F2 ha avuto una maggiore prevalenza di lesioni nelle aree di: orecchie, quarto anteriore e coda. Le lesioni alla coda e alle orecchie sono un noto indicatore di stress e di scarso benessere nei suini in tutte le fasi di allevamento (Martínez-Miró et al., 2016). Le lesioni al quarto anteriore (lesioni facciali comprese) possono verificarsi come conseguenza di ripetuti pareggiamenti delle nidiate, a causa dell'instabilità

gerarchica conseguente il mescolamento (Rutherford et al., 2013). Il pareggiamento delle nidi, se ripetuto più volte nello stesso ciclo, è considerato una pratica dannosa e controproducente a causa delle lotte gerarchiche e dell'aumento di competizione per la mammella (Baxter et al., 2013). La competizione per la mammella può verificarsi sia in caso di mescolamento (i suinetti sviluppano da subito un ordine di capezzolo) o nel caso in cui le mammelle non siano in numero sufficiente per tutti i suinetti e/o la quantità di latte prodotta dalla scrofa non sia adeguata (Baxter et al., 2013; Rutherford et al., 2013). Lo stress che ne deriva è stato associato anche ad un incremento delle lesioni alla coda come dimostrato da Moinard (2003), il quale riportava che il pareggiamento ripetuto aumenta l'insorgenza della morsicatura della coda dopo lo svezzamento. Tuttavia, poiché entrambe le aziende adottano una strategia di pareggiamento delle nidi ripetuto, questo fattore potrebbe non essere la causa principale della differenza tra essi. Considerato che F2 aveva una maggiore numerosità delle nidi, questo fattore potrebbe aver contribuito alla maggiore presenza di lesioni alla coda in F2, in accordo con quanto già osservato nei suinetti svezzati (Lahrmann et al., 2018; Van de Weerd et al., 2005; Zonderland et al., 2011). In nidi numerose, la competizione per i capezzoli è maggiore, secondo quanto riportato da Baxter et al. (2013); tuttavia, il parametro numero di mammelle/suinetto non ha mostrato differenze tra le aziende oggetto di studio. Quello che è emerso è che entrambe le aziende hanno fornito latte supplementare ai suinetti, utilizzando diversi sistemi di distribuzione. F1 ha somministrato latte supplementare *ad libitum* usando la distribuzione automatica, mentre F2 lo distribuiva manualmente due volte al giorno. Si può ipotizzare che la differenza nel sistema di distribuzione del latte supplementare abbia influenzato l'insorgenza di lesioni nel quarto anteriore, in quanto una maggiore disponibilità di latte ricostituito potrebbe aver ridotto i comportamenti aggressivi limitando la competizione per le mammelle. In letteratura è stato riscontrato l'effetto positivo del latte supplementare sui parametri produttivi dei suinetti (Kobek-Kjeldager et al., 2019; Wolter et al., 2002), ma non sono stati trovati studi specifici su come il sistema di distribuzione del latte (in aggiunta al latte di scrofa), possa influire sulla frequenza di lesioni cutanee e di comportamenti aggressivi. Questa ipotesi necessita di approfondimenti e studi ulteriori.

In associazione all'età dei suinetti è stato possibile osservare una maggiore prevalenza, il giorno prima dello svezzamento (T2), del punteggio di classe media nelle seguenti aree: quarto anteriore, tronco, arti posteriori e coda. In T2, è stato osservato un aumento della lacrimazione. Questo parametro è stato valutato nell'occhio sinistro, poiché questo è collegato all'emisfero cerebrale destro il quale ha il ruolo principale nell'elaborazione delle emozioni negative (Leliveld et al., 2013). I dati, mostrano che i suinetti di 20 giorni hanno una prevalenza maggiore di lesioni cutanee nella gran parte delle aree del corpo (coda inclusa) rispetto ai suinetti di una settimana. L'aumento delle lesioni è considerato un indicatore negativo di benessere animale. La presenza di lacrimazione sembra suggerire un nesso tra un peggioramento di benessere animale e l'età dei suinetti, come precedentemente osservato in suini all'ingrasso, dove un aumento della lacrimazione è stato associato ad un aumento dello stress nel tempo (Larsen et al., 2019). La lacrimazione è stata anche correlata ad una maggiore prevalenza di lesioni della coda da Larsen et al. (2019) e Telkänrananta et al. (2016) nei suini in accrescimento. Questo è il primo studio che ha indagato tale parametro nei suinetti sottoscrofa, e i risultati necessitano di validazioni.

Nei mesi più freddi è stata osservata una maggiore prevalenza di diarrea e di lesioni lievi agli arti. La temperatura nelle gabbie parto e nel nido non differivano nelle due stagioni considerate, quindi, si suppone che condizioni ambientali e di management non misurate nel presente studio (es. umidità e velocità dell'aria) potrebbero aver influenzato la presenza di diarrea e di lesioni agli arti, in accordo con precedenti studi (Muns et al., 2016).

Uno studio recente di Pandolfi et al. (2017) riporta che le lesioni agli arti possono essere influenzate dalla stagione, specialmente in inverno, quando il livello di attività è maggiore; la presenza o meno di arricchimenti ambientali sarebbe in grado di ridurre la prevalenza di lesioni corporee, agli arti e di zoppie in suini di tutte le età. Entrambi gli allevamenti oggetto di studio non disponevano di materiale manipolabile destinato ai suinetti, pertanto non si esclude che la presenza di idonei arricchimenti possano avere un effetto sulla riduzione delle lesioni in inverno.

Dalla presente ricerca è stato rilevato che il taglio della coda non ha influenzato la prevalenza delle lesioni cutanee ad eccezione delle lesioni alla coda, che sono risultate maggiori nei suinetti a CT rispetto a quelli a CI. Questo risultato è in disaccordo con quanto riscontrato da Tallet et al., (2019) che ha evidenziato maggiori lesioni della coda nei suinetti a coda integra. Poiché la morsicatura alla coda presenta fattori di rischio multifattoriali (Grümpel et al., 2018), le differenze possono essere correlate alle specifiche condizioni di allevamento, rendendo impreciso il confronto tra gli studi che coinvolgono poche aziende. Una bassa temperatura ambientale era associata a maggiore prevalenza di lesioni gravi agli arti e scarso punteggio BCS. È infatti noto che quando i suinetti hanno freddo, si accalcano gli uni agli altri o restano vicini alla scrofa o al nido (Edwards e Baxter, 2015). Una crescita ridotta è stata osservata, in passato, in suinetti allevati con temperature inferiori al livello ottimale, risultando in un peggioramento del BCS (Muns et al., 2016). Il tentativo dei suinetti di far fronte alle basse temperature può comportare un aumento della prevalenza di lesioni agli arti a causa dello schiacciamento da parte degli altri suinetti o della scrofa (Edwards e Baxter, 2015). Al contrario, con temperature elevate del nido è stata riscontrata una maggiore presenza di lesioni carpali, di lesioni alla coda gravi e di suinetti che necessitavano di cure supplementari. Uno studio di Phillips et al (1992), ha dimostrato che la pavimentazione del nido è in grado di assorbire parte del calore della lampada, influenzando lo sviluppo di lesioni carpali e podali nei suinetti. Ad una temperatura del nido pari a 30°C, la prevalenza di lesioni carpali, in assenza di lettiera, aumenta in poche ore in qualsiasi tipo di pavimentazione (Phillips et al., 1992). Questo spiegherebbe il risultato ottenuto nel presente studio, poiché la temperatura del nido era tra 21,10°C e 39,90°C. Lo stress termico ha probabilmente aumentato la prevalenza di suinetti bisognosi di cure supplementari (es. di trattamenti sanitari). La presenza di diarrea era correlata a una bassa temperatura del nido. Anche la luce, inferiore al minimo di 40 lux, come definito dalla Dir. 2008/120 CE, era positivamente correlata a una maggiore prevalenza di suinetti bisognosi di cure supplementari. Per quanto a conoscenza degli autori, nessun altro studio ha verificato l'effetto dell'intensità della luce sui parametri LS, quindi l'effetto della luce sui suinetti non è ancora chiaro. Infine, un minore rapporto di capezzoli disponibili per suinetto, era correlato ad una maggiore presenza di zoppie. Secondo quanto riportato da Edwards e Baxter (2015), i suinetti che incontrano difficoltà a raggiungere il capezzolo, preferiscono trascorrere più tempo vicino alla scrofa per assicurarsi l'approvvigionamento di latte. Questo comportamento potrebbe esporre i suinetti al rischio di essere schiacciati dalla scrofa, aumentando l'incidenza di zoppie, ferite agli arti o persino morte per schiacciamento (Quinn et al., 2015).

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha confermato che l'insorgenza di lesioni avviene già sottoscrofa con prevalenza di lesioni ad orecchie, coda e lesioni carpali. Dai risultati è stato evidenziato che le condizioni di allevamento quali: numerosità delle nidiate, sistema di distribuzione del latte supplementare, numero di capezzoli per suinetto e temperatura della gabbia parto e del nido, sono i fattori che hanno influenzato maggiormente la prevalenza di lesioni

derivanti da comportamenti aggressivi. Inoltre si è evidenziato che la presenza di lesioni aumenta con l'età, a conferma che questo fattore deve essere tenuto in considerazione quando viene valutato il benessere animale in questa fase. Infine, il taglio della coda non ha prevenuto il numero o la gravità di lesioni alla coda, che sono risultate già presenti in questa fase di allevamento. Considerati i risultati ottenuti, sarebbe necessario implementare la valutazione del benessere animale e l'identificazione di strategie preventive anche nei suinetti sottoscrofa.

## **RINGRAZIAMENTI**

I dati presentati sono stati raccolti nel Progetto Filiera F61 – Reg. (UE) 1305/2013 – PSR 2014/2020 DGR Emilia-Romagna n. 227/2017 e s.m.i. - FOCUS AREA 3A - Operazione 16.2.01 con capofila Fontane del Duca. Si ringraziano per la collaborazione gli allevatori partner del progetto.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. “AssureWel Protocol for Pigs and Dry Sows: Lameness.” Available online: <http://www.assurewel.org/pigs/lameness> (ultimo accesso 26/01/2019).
2. Alborali G.L. and Bertocchi L. “Benessere animale: linee guida per la categorizzazione del rischio nell'allevamento suino dallo svezzamento all'ingrasso.” Disponibile online: <http://www.classifarm.it> (ultimo accesso 26/01/2019).
3. 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, 219–238.
4. Edwards, S.A. and Baxter, E.M., (2015). “Piglet mortality: causes and prevention”. In: Farmer C. editor, *The gestating and lactating sow*. Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. p. 193–230.
5. Grümpel, A., Krieter, J., Veit, C., Dippel, S., (2018). “Factors influencing the risk for tail lesions in weaner pigs (*Sus scrofa*)”. *Livest. Sci.* 216, 219–226.
6. Johnson, A.K., Marchant-Forde, J.N., (2008). “Welfare of Pigs in the Farrowing Environment, in: *The Welfare of Pigs*.” Springer Netherlands, Dordrecht, pp. 141–188.
7. Klaaborg, J., Kristensen, A.R., Brandt, P., (2019). “The effect of pen environment on pen-mate directed behaviour prior to feeding in finisher pigs with intact tails.” *Livest. Sci.* 219, 35–39.
8. Kobek-Kjeldager, C., Moustsen, V.A., Theil, P.K., Pedersen, L.J., (2019). “Effect of litter size, milk replacer and housing on production results of hyper-prolific sows.” *animal* 1–10.
9. Lachance, M.P., Laforest, J.P., Devillers, N., Laperrière, A., Farmer, C., (2010). “Impact d'une photopériode prolongée en maternité sur les performances et le comportement des truies et de leurs porcelets.” *Can. J. Anim. Sci.* 90, 311–319.
10. Lahrmann, H.P., Hansen, C.F., D'Eath, R., Busch, M.E., Forkman, B., (2018). “Tail posture predicts tail biting outbreaks at pen level in weaner pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 200, 29–35.
11. Larsen, M.L. V., Gustafsson, A., Marchant-Forde, J.N., Valros, A., (2019). “Tear staining in finisher pigs and its relation to age, growth, sex and potential pen level stressors”. *Animal* 1–8.
12. Leliveld, L.M.C., Langbein, J., Puppe, B., (2013). “The emergence of emotional lateralization: Evidence in non-human vertebrates and implications for farm animals.” *Appl. Anim. Behav. Sci.* 145(1-2), 1-14.

13. Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., Orengo, J., Martínez-Subiela, S., Manteca, X., Cerón, J.J., (2016). "Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update." *BMC Vet. Res.* 12, 171.
14. Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J., Green, L.E., (2003). "A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs." *Appl. Anim. Behav. Sci.* 81, 333–355.
15. Muns, R., Nuntapaitoon, M., Tummaruk, P., (2016). "Non-infectious causes of pre-weaning mortality in piglets." *Livest. Sci.* 184, 46-57.
16. Nalon, E., De Briyne, N., (2019). "Efforts to ban the routine tail docking of pigs and to give pigs enrichment materials via EU law: Where do we stand a quarter of a century on?" *Animals.* 9(4), 132.
17. Nannoni, E., Sardi, L., Vitali, M., Trevisi, E., Ferrari, A., Barone, F., Bacci, M.L., Barbieri, S., Martelli, G., (2016). "Effects of different enrichment devices on some welfare indicators of post-weaned undocked piglets". *Appl. Anim. Behav. Sci.* 184, 25–34.
18. Pandolfi, F., Stoddart, K., Wainwright, N., Kyriazakis, I., Edwards, S.A., (2017). "The 'Real Welfare' scheme: benchmarking welfare outcomes for commercially farmed pigs." *Animal* 1–9.
19. Peden, R.S.E., Turner, S.P., Boyle, L.A., Camerlink, I., (2018). "The translation of animal welfare research into practice: The case of mixing aggression between pigs." *Appl. Anim. Behav. Sci.* 204, 1–9.
20. Phillips, P. A., Fraser, D., Buckley, D. J. (1992). Simulation tests on the effect of floor temperature on leg abrasions in piglets. *Transactions of the ASAE*, 35(3), 999-1003.
21. Quinn, A.J., Boyle, L.A., KilBride, A.L., Green, L.E., (2015). "A cross-sectional study on the prevalence and risk factors for foot and limb lesions in piglets on commercial farms in Ireland." *Prev. Vet. Med.* 119, 162–171.
22. R Core Team. (2017). R: "A language and environment for statistical computing." Vienna, Austria: R. Foundation for Statistical Computing.
23. Rutherford, K.M.D., Baxter, E.M., D'Eath, R.B., Turner, S.P., Arnott, G., Roehe, R., Ask, B., Sandøe, P., Moustsen, V.A., Thorup, F., Edwards, S.A., Berg, P., Lawrence, A.B., (2013). "The welfare implications of large litter size in the domestic pig I: Biological factors." *Anim. Welf.* 22, 199–218.
24. Simitzis, P.E., Veis, D., Demiris, N., Charismiadou, M.A., Ayoutanti, A., Deligeorgis, S.G., (2013). "The effects of the light regimen imposed during lactation on the performance and behaviour of sows and their litters." *Appl. Anim. Behav. Sci.* 144, 116–120.
25. Skok, J., Prevolnik, M., Urek, T., Mesarec, N., Škorjanc, D., (2014). "Behavioural patterns established during suckling reappear when piglets are forced to form a new dominance hierarchy". *Appl. Anim. Behav. Sci.* 161, 42–50.
26. Skok, J., Škorjanc, D., (2013). "Formation of teat order and estimation of piglets' distribution along the mammary complex using mid-domain effect (MDE) model." *Appl. Anim. Behav. Sci.* 144, 39–45.
27. Tallet, C., Rakotomahandry, M., Herlemont, S., Prunier, A., (2019). "Evidence of Pain, Stress, and Fear of Humans During Tail Docking and the Next Four Weeks in Piglets (*Sus scrofa domestica*)." *Front. Vet. Sci.* 6.
28. Telkänranta, H., Edwards, S.A., (2018). "Lifetime consequences of the early physical and social environment of piglets." *Adv. Pig Welf.* 101–136.
29. Telkänranta, H., Marchant-Forde, J.N., Valros, A., (2016). "Tear staining in pigs: a potential tool for welfare assessment on commercial farms." *animal* 10, 318–325.



30. 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.
31. 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." *Anim. Sci.* 80, 289–298.
32. Vasdal, G., Wheeler, E.F., Bøe, K.E., (2009). "Effect of infrared temperature on thermoregulatory behaviour in suckling piglets." *animal* 3, 1449–1454.
33. Wallgren, T., Lundeheim, N., Wallenbeck, A., Westin, R., Gunnarsson, S., (2019). "Rearing Pigs with Intact Tails-Experiences and Practical Solutions in Sweden." *Anim. an open access J. from MDPI* 9, 812.
34. Welfare Quality®. Welfare Protocol® Assessment Protocol for Pigs (Sows and Piglets, Growing and Finishing Pigs). Welfare Quality® Consortium: Lelystad, The Netherlands, 2009; Available online: [http://www.welfarequality.net/media/1018/pig\\_protocol.pdf](http://www.welfarequality.net/media/1018/pig_protocol.pdf) (accessed on 19 August 2019).
35. 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 preweaning and postweaning growth performance and carcass characteristics1." *J. Anim. Sci.* 80, 301–308.
36. Zonderland, J.J., Schepers, F., Bracke, M.B.M., Den Hartog, L.A., Kemp, B., Spoolder, H.A.M., (2011). "Characteristics of biter and victim piglets apparent before a tail-biting outbreak." *Animal* 5, 767–775.





# VALUTAZIONE DELL'EFFICACIA DEL CARAZOLOLO NELLA RIDUZIONE DI FENOMENI DI MORSICATURA NEL SUINO A CODA LUNGA

## ASSESSMENT OF THE EFFECTIVENESS OF CARAZOLOL IN THE REDUCTION OF BITING BEHAVIOUR IN UNDOCKED PIGS

GALLI M.C.<sup>1,2</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>, CONTIERO B.<sup>2</sup>, DELLI ROCIOLI G.<sup>3</sup>, MAZZONI C.<sup>1</sup>,  
GOTTARDO F.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Libero professionista, Swivet Research snc*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova*

<sup>3</sup>*Marketing Fatro S.p.a.*

**Parole chiave:** carazololo, aggressività (morsicatura coda), coda lunga

**Key Words:** carazolol, aggressiveness (tail-biting), undocked pig

### RIASSUNTO

Spinto dalla richiesta della Commissione europea, il Ministero della Salute ha redatto un Piano d'azione che prevede che tutti gli allevamenti, in seguito all'eliminazione dei fattori di rischio predisponenti al cannibalismo, introducano gradualmente gruppi di suini a coda integra. Tuttavia, anche in seguito alla risoluzione dei principali punti critici, la gestione degli animali a coda lunga non risulta così facile e immediata.

Il presente studio ha voluto valutare l'efficacia del Carazololo nella riduzione dei fenomeni di aggressività, con particolare riferimento alla morsicatura della coda. Per la prova sono stati coinvolti 172 suinetti a coda integra, suddivisi in due gruppi: il gruppo controllo costituito da suinetti che presentavano lesioni da morsicatura gestite esclusivamente con un buon management, il gruppo trattato costituito da suinetti che presentavano lesioni da morsicatura e trattati con Carazololo per 3 giorni, oltre alla gestione con un buon management. In seguito all'evento di morsicatura gli animali sono stati monitorati per 4 giornate, durante le quali sono state registrate le osservazioni comportamentali e le lesioni riportate sulla coda degli animali. Lo studio ha ben evidenziato come l'utilizzo di Carazololo durante fenomeni intensi di morsicatura riesca a contenere questo evento, riducendo in modo significativo sia l'espressione del comportamento che le lesioni ad esso correlate. È comunque importante sottolineare che l'utilizzo del farmaco non dovrebbe essere somministrato come unico intervento di riduzione del fenomeno di morsicatura, bensì il suo utilizzo dovrebbe essere affiancato al miglioramento delle condizioni di allevamento.

### ABSTRACT

Driven by the request of the European Commission, the Ministry of Health has drawn up an Action Plan which provides that all farms, following the elimination of risk factors predisposing to cannibalism, gradually introduce groups of long-tail pigs. However, even after the resolution of the main critical points, the management of long-tail animals is not so easy and immediate. The present study aimed to evaluate the effectiveness of Carazolol in reducing aggression phenomena, in particular referring to tail-biting. 172 intact piglets were involved in the test, divided into two groups: the control group consisting of piglets that had biting lesions managed exclusively with good management, the treated group consisting of piglets that had biting lesions and treated with Carazolol for 3 days, in addition to good management. Following the biting event, the animals were monitored for 4 days, during which the behavioral

observations and injuries reported on the tail were recorded. The study has clearly shown how the use of Carazolol during intense biting phenomena manages to contain this event, significantly reducing both the expression of the behavior and the lesions related to it. It is however important to emphasize that the use of the drug should not be administered in a preventive form and that its use should always be accompanied by the improvement of farming conditions.

## **INTRODUZIONE**

La legislazione attuale in vigore (Direttiva 2008/120/ CE) sancisce il divieto nell'effettuare il taglio della coda dei lattonzoli come intervento di routine. Tuttavia, fino a poco più di un anno fa la quasi totalità degli allevamenti italiani continuava ad effettuare tale operazione, dichiarando la difficoltà della propria azienda nel gestire suini a coda lunga, i quali manifestavano gravi ferite per caudofagia. La Direttiva prevede però che l'autorizzazione per effettuare il taglio della coda abbia valore solo ed esclusivamente se in azienda è presente l'evidenza che tutti i fattori di rischio predisponenti al cannibalismo siano stati modificati ed eliminati, e che nonostante le migliori effettuate permangano tali fenomeni. L'Audit europeo del 2017, realizzato per determinare l'adequatezza e l'efficacia delle misure messe in atto dal nostro Paese al fine di evitare il taglio della coda di routine, ha messo in luce l'assenza sostanziale di tali procedure preventive e di piani di modifica delle condizioni ambientali volte a dare evidenza degli sforzi sostenuti per ottenere un allevamento del suino a coda lunga. Per risolvere questo inadempimento il Ministero della Salute ha redatto un Piano d'azione che ha previsto, attraverso diverse fasi, che a partire dal primo gennaio 2020 tutti gli allevamenti abbiano risolto eventuali punti critici e introducano gradualmente gruppi di suini a coda integra.

La gestione dei suini a coda lunga, soprattutto nella fase di svezzamento e ancor di più per coloro che non hanno mai intrapreso questo tipo di allevamento, risulta complessa. La caudofagia è infatti un problema multifattoriale (EFSA, 2007) e la risoluzione dei punti critici messi in evidenza dal Piano d'azione non sempre porta ad un'immediata e perfetta gestione degli animali a coda integra. Inoltre anche negli allevamenti dove da diversi anni vengono allevati con successo suini a coda lunga occasionalmente si possono presentare fenomeni intensi di cannibalismo, dovuti ad eventi stressanti transitori quali malattie (Moinard, 2003) o variazioni di temperatura e umidità (Schröder-Petersen and Simonsen, 2001). Infine risulta complessa anche la gestione dell'eventuale soggetto morsicatore, per il quale si prospetta, nella migliore delle ipotesi, un periodo di isolamento.

Alla luce di queste problematiche emergenti si è voluto valutare se l'utilizzo di Carazololo, grazie alla sua attività beta-bloccante, potesse essere efficace nella gestione comportamentale di intensi fenomeni di cannibalismo tra suini a coda lunga. Il Carazololo infatti, presentando una struttura analoga alle catecolamine (adrenalina e noradrenalina), si fissa con legame reversibile sui recettori  $\beta$ -adrenergici, ostacolandone l'attivazione da parte dell'adrenalina e della noradrenalina. La somministrazione del Carazololo contrasta gli effetti negativi indotti dallo stress, inibendo le alterazioni fisiologiche (aumento della frequenza cardiaca e respiratoria) e comportamentali (ansia, paura, aggressività ed irrequietezza) indotte dal rilascio di catecolamine. Per queste sue proprietà il Carazololo potrebbe avere azione calmante pur senza effetti sedativo-anestetici durante i fenomeni di morsicatura rivelatori di una situazione stressante per gli animali.

## **MATERIALI E METODI**

La ricerca è stata svolta presso un allevamento suinicolo sito in provincia di Mantova che si occupa dell'allevamento dei suinetti nelle dieci settimane post-svezzamento. L'allevamento selezionato alleva suini a coda lunga da circa 4 anni, e vanta personale addetto specializzato nella gestione di problematiche di morsicatura tramite la gestione dei fattori di rischio aziendali,

degli arricchimenti ambientali, e dell'analisi comportamentale degli animali per l'individuazione del morsicatore. Per la prova sono stati coinvolti 352 suinetti appena svezzati (28 giorni di età), appartenenti alla stessa banda, con provenienza, data di svezzamento e genetica (Hypor) comune a tutti i soggetti. A nessun suinetto era stata effettuata la caudectomia e quindi presentavano la coda in tutta la sua lunghezza. Gli animali sono stati stabulati nella medesima struttura, in modo da garantire condizioni ambientali uguali ai diversi gruppi, questi ultimi composti da soggetti con peso iniziale omogeneo. Gli animali sono stati distribuiti in quattro box, di circa 90 suini, identici tra loro sia nella struttura (pavimentazione a grigliato, rastrelliera con la paglia, fronte mangiatoia, numero e posizione degli abbeveratoi) che nella gestione (personale addetto agli animali, orientamento nord-sud, razione alimentare a secco ad libitum).

Gli animali sono stati monitorati con osservazione del comportamento e delle lesioni alla coda fino all'insorgenza di problematiche di morsicatura in due dei quattro box presi in considerazione. Questi sono stati casualmente associati ai due gruppi sperimentali: gruppo controllo (C) e gruppo trattato (T). Il gruppo C era costituito da 88 suinetti che presentavano lesioni da morsicatura alla coda gestite esclusivamente con un buon management (aggiunta di oggetti di plastica ed altri arricchimenti nel box), il gruppo T era costituito da 84 suinetti che presentavano lesioni da morsicatura e trattati con Carazololo (Simpanorm®, Fatro, 2ml/q.le pv) per 3 giorni, oltre alla gestione con un buon management. La somministrazione del farmaco è stata effettuata a 37 giorni dall'accasamento, in concomitanza con l'insorgenza dei primi fenomeni di morsicatura (T37), e si è prolungata fino ai due giorni successivi.

Prima dell'evento di morsicatura al giorno 37, gli animali erano stati monitorati per valutarne il comportamento già dall'accasamento. La prova ha avuto durata dunque di 40 giorni, ovvero dalla data di accasamento alla risoluzione dell'evento di morsicatura sviluppatosi durante l'accrescimento. Durante tutta la prova sono stati registrati per ciascun gruppo la mortalità e l'utilizzo di antibiotico (somministrato per via parenterale e orale) che è stato necessario somministrare. In seguito all'evento di morsicatura gli animali sono stati monitorati da un operatore per osservazione diretta per un totale di 4 giornate (T26, T28, T36, T 38). La tecnica utilizzata per la raccolta diretta dei dati comportamentali è stata lo scan-sampling (Martin and Bateson, 2007), con intervalli di 2 (4) minuti per ciascuno scan ed un totale di 42 (84) minuti di osservazione di tutti gli animali. I parametri comportamentali osservati sono stati: interazione con il cesto della paglia, interazione con la paglia caduta a terra dal cesto, disteso/dorme, interazione con le strutture del box (muri, cancelli, abbeveratoi ecc), interazione con gli arricchimenti ambientali diversi dalla paglia, interazione con altri suini, numero di animali coinvolti in conflitti, numero di morsi alle orecchie, numero di morsi alla coda, suini che si alimentano, belly nosing. Contestualmente alla rilevazione diretta del comportamento, tutti gli animali sono stati individualmente controllati per la valutazione delle lesioni alla coda secondo una scala di gravità da 0 a 2: il punteggio 0 è stata attribuito a quelle code che non presentavano alcun tipo di lesione, 1 per quelle che presentavano lesioni lievi senza la presenza di sangue fresco, 2 per lesioni gravi con presenza di sangue fresco. Durante la prova sono stati inoltre effettuati due prelievi di sangue (uno a T15 ed uno a T30), per valutare l'eventuale presenza del virus PRRS, in quanto frequentemente riscontrato in azienda nei cicli precedenti e responsabile, secondo la bibliografia (Moinard et al., 2003; Kritas and Morrison, 2007), di un maggiore rischio di insorgenza di morsicature alla coda. I 30 prelievi sono stati effettuati sempre sugli stessi animali, identificati con marca auricolare con numero univoco all'inizio della prova e suddivisi in 3 categorie: figli di scrofette, figli di pluripare, animali sottopeso. I campioni di siero sono stati portati all'IZS di Reggio Emilia per le analisi.

Le percentuali medie per intervallo di tempo di osservazione relative al numero di animali che hanno esibito un particolare comportamento sono state analizzate con il test non parametrico di confronto per saggiare l'effetto del trattamento (pre vs post). Per le variabili relative alla

mortalità e al consumo di antibiotico (normalmente distribuite) è stato applicato un modello di ANOVA.

Relativamente alle variabili relative alla mortalità e ai consumi di antibiotico è stato utilizzato il modello ANOVA per il confronto tra le medie.

## RISULTATI

Nel grafico 1 sono riportate le frequenze dei principali comportamenti per i due gruppi, C e T, riferita all'osservazione effettuata a T38. Dall'analisi dei dati emerge che i suini del gruppo T, limitatamente all'immediato post-trattamento, trascorrono più tempo, rispetto a quelli del gruppo C, a contatto con il cesto di paglia e con la paglia stessa ( $p < 0.001$ ), mentre passano meno tempo distesi o a dormire ( $p < 0.001$ ). Dal grafico emerge inoltre una minor frequenza nel gruppo T di morsi alla coda ( $p < 0.01$ ), mentre risulta maggiore quella di conflitti ( $p < 0.05$ ) e belly nosing ( $p < 0.01$ ). Infine, sempre relativamente all'immediato post-trattamento, la percentuale di animali che si alimentano risulta significativamente inferiore nel gruppo T rispetto al gruppo C ( $p < 0.01$ ).

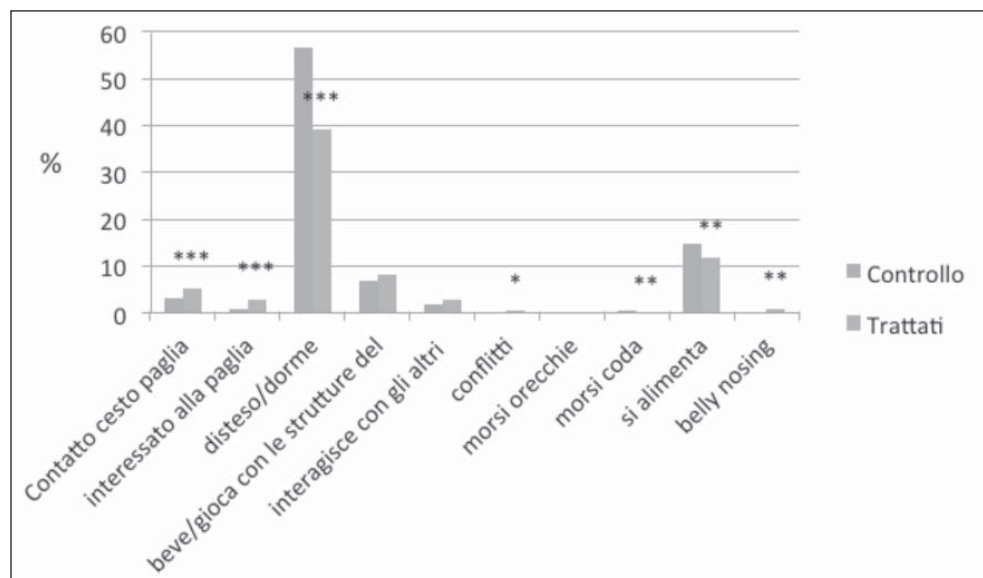
**Grafico 1.** Effetto del trattamento sul comportamento dei suinetti (C vs. T)

**Graphic 1.** The effect of treatment on piglet behavior (C vs. T)

\* parametro statisticamente significativo per P-value  $< 0,05$

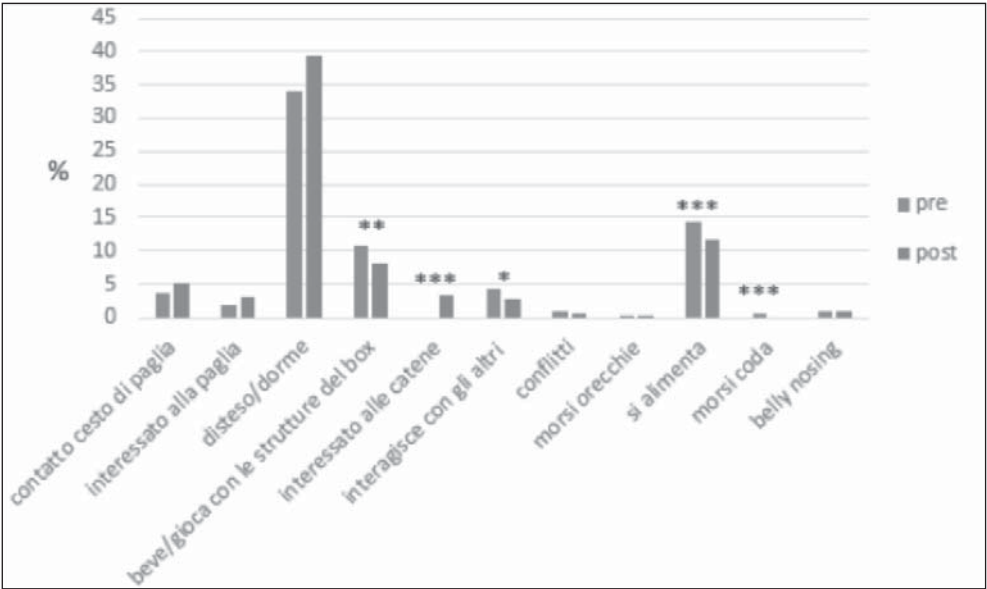
\*\* parametro statisticamente significativo per P-value  $< 0,01$

\*\*\* parametro statisticamente significativo per P-value  $< 0,001$



Nel grafico 2 viene riportata l'analisi comportamentale riferita esclusivamente al gruppo Trattato, mettendo a confronto le osservazioni effettuate quando agli animali non era stato somministrato alcun farmaco (T26, T28, T36, pre) con quella effettuata successivamente alle prime due somministrazioni (T38, post). In seguito al trattamento con il Carazololo si delinea una riduzione della percentuale di animali che interagisce con le strutture del box ( $p < 0.01$ ), che interagisce con gli altri suini, che si alimenta, e che morde la coda di un altro suino ( $p < 0.001$ ), aumenta invece la percentuale di animali interessati altri arricchimenti presenti nel box (catene, oggetti in plastica) ( $p < 0.001$ ).

**Grafico 2.** Effetto del trattamento sul comportamento dei suinetti (pre vs. post trattamento)  
**Graphic 2.** The effect of treatment on piglet behavior (pre vs. post treatment)



Per quanto riguarda le lesioni alla coda, dal Grafico 3 emerge chiaramente come per il gruppo C le lesioni di punteggio 2 che presentano quindi sangue fresco sono stabili al 14,8%, mentre per il gruppo trattato con Carazololo, di osserva una loro drastica riduzione (26.2% pre-trattamento vs 0% post-trattamento)-

**Grafico 3.** Andamento del lesion score 2  
**Graphic 3.** Lesion score 2 trend



Per quanto concerne i risultati relativi ai prelievi ematici, in entrambi i momenti di prelievo (T15 e T30) tutti gli animali sono risultati negativi alla PCR per il virus PRRS, con livello sierologici anticorpali S/P < 0,7.

Relativamente alla mortalità e all'utilizzo di antibiotici, non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi.

## **DISCUSSIONE**

Considerando i dati comportamentali gli animali del gruppo T, nonostante il trattamento con Carazololo, risultano maggiormente impegnati in attività quale l'esplorazione degli arricchimenti ambientali (ed a frequenze molto basse anche i conflitti e il belly nosing) e meno in attività statiche come il rimanere disteso o dormire. Risultano invece inferiori i fenomeni di morsicatura della coda. Da questa prima analisi sembrerebbe emergere che il farmaco esplica la sua attività esclusivamente nel diminuire la comparsa del comportamento dannoso di morsicatura della coda. Tuttavia, confrontando il comportamento degli animali del gruppo T prima e dopo la somministrazione di Carazololo emerge che questo ha un effetto anche nella diminuzione dell'attività cinetica (beve/gioca con le strutture del box, interagisce con gli altri) e alimentare, oltre che sui fenomeni di morsicatura della coda. E' verosimile che la diminuzione nel tempo delle attività cinetiche ed alimentari, oltre che delle morsicature, sia temporaneo: in uno studio del 1988, Gonyou et al. avevano infatti osservato una riduzione del tempo passato ad alimentarsi il giorno stesso della somministrazione di un farmaco "anti-stress" (amperossido), ma anche un successivo aumento al giorno 2, probabilmente come effetto compensatorio. Infatti le performance produttive erano rimaste uguali rispetto al gruppo controllo. Purtroppo nel nostro studio non è stata effettuata una rilevazione protratta ai giorni seguenti che può confermare la tesi di Gonyou et al., ed ulteriori studi potrebbero essere necessari per approfondire questo aspetto. Tenendo conto di questa tesi però, è verosimile pensare che il recupero della normale attività alimentare nei giorni seguenti sia accompagnata anche recupero delle attività cinetiche placate dall'azione del farmaco. Questo presuppone la necessità di utilizzare la terapia comportamentale farmacologica solo ed esclusivamente accompagnata da una buona gestione manageriale del gruppo di animali, con la riduzione dei fattori di rischio per la morsicatura, la rimozione del suino morsicatore (o i suini morsicatori), e l'introduzione di nuovi arricchimenti ambientali. In questo modo, la terapia farmacologica diventa un aiuto per la gestione acuta del problema, ma non deve in alcun modo essere considerata una sostituzione delle buone pratiche manageriali, pena il probabile ritorno ai fenomeni di morsicatura pre-trattamento.

In seguito al trattamento con Carazololo sembrerebbe aumentare la percentuale di animali che interagiscono con le catene, tuttavia questo fenomeno è probabilmente legato all'aggiunta nella fase post-trattamento di altri arricchimenti ambientali (es. oggetti di plastica o legno) per la riduzione del rischio di morsicatura, la cui interazione è rientrata nel parametro "interessato alle catene", e che ha determinato un aumento di questa percentuale.

La minor percentuale di fenomeni di morsicatura della coda, sia nel confronto tra gruppi sia nel confronto pre/post, si manifesta di riflesso in una diminuzione drastica delle lesioni con sangue nel post-trattamento, mentre rimangono stazionarie nel gruppo controllo.

## **CONCLUSIONI**

Lo studio ha evidenziato come l'utilizzo di Carazololo durante fenomeni intensi di morsicatura riesca a contenere questo evento, riducendo in modo significativo sia l'espressione del comportamento che le lesioni ad esso correlate. Il confronto del comportamento dei suini prima e dopo il trattamento ha fatto emergere una diminuzione anche di altre attività tra cui l'alimentarsi, sintomo probabilmente di uno stato di letargia verosimilmente compensato successivamente alla fine dell'effetto del farmaco. La breve efficacia clinica del farmaco (circa



10 ore) e la consapevolezza che il suo utilizzo dovrebbe essere circoscritto unicamente alla risoluzione di un fenomeno acuto di morsicature, suggerisce che questo non abbia ripercussioni sulle performance e sullo stato sanitario degli animali. Uno studio che preveda il monitoraggio dei parametri di accrescimento durante tutta la fase di svezzamento sarebbe interessante per confermare questa ipotesi, già espressa da altri autori. È comunque importante sottolineare che l'utilizzo del farmaco non dovrebbe essere somministrato come unico intervento di riduzione del fenomeno di morsicatura, bensì andrebbe sempre associato alla riduzione del rischio dei fattori scatenanti. La sua somministrazione potrebbe essere efficace nel risolvere nell'immediato una situazione di emergenza, permettendo all'allevatore di avere il tempo necessario nel mettere in atto quelle misure correttive di non immediata realizzazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Direttiva 2008/120/CE del Consiglio del 18/12/2008 – GUCE L 47/S, 18/02/2009 “Norme minime per la protezione dei suini”.
2. EFSA (2007). “Scientific Report on the risk associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the need to tail docking considering the different housing and husbandry systems”. The EFSA Journal 611:4-13.
3. Gonyou H.W., Parfet K.A.R., Anderson D.S.B., et al. (1988). J Anim Sci 66:2856-2864.
4. Kritas, S.K. and Morrison, R.B. (2007) “Relationships between tail biting in pigs and disease lesions and condemnations at slaughter”. Vet. Rec., 160, 149-152.
5. Martin P. and Bateson P. (2007) “Measuring Behaviour: An Introductory Guide” (third ed.), Cambridge, Cambridge University Press.
6. Moinard, C., Mendl, M., Nicol, C.J. and Green, L.E. (2003) “A case control study of on-farm risk factors for tail biting in pigs”. Appl. Anim. Behav. Sci. 81, 333-355.
7. Schröder-Petersen, D.L. and Simonsen, H.B. (2001) “Tail biting in pigs”. Vet. J. 162, 196-210.



# OSSERVAZIONI PRELIMINARI SULLA PREVALENZA E DISTRIBUZIONE DELLE LESIONI AL PIEDE DELLE SCROFE AL MACELLO

## PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE PREVALENCE AND DISTRIBUTION OF FOOT LESIONS IN CULLED SOWS AT SLAUGHTERHOUSE

GINESTRETI J.<sup>1</sup>, CUTRONEO E.<sup>1</sup>, MAISANO A.M.<sup>1</sup>, BIONDO A.<sup>2</sup>, VEZZOLI F.<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna,  
Sede Territoriale di Lodi*

*<sup>2</sup>ATS Città Metropolitana di Milano*

**Parole chiave:** scrofe, macello, lesioni podali

**Key words:** culled sows, slaughterhouse, foot lesions

### RIASSUNTO

Le lesioni podali e la zoppia sono la seconda causa di riforma forzata in allevamento e rappresentano un problema di tipo economico e di benessere animale strettamente legato alle condizioni di stabulazione. L'obiettivo di questo studio è stato quello di raccogliere dati sulla prevalenza e sulla tipologia delle lesioni podali in questa categoria. Sono state raccolte al macello le lesioni di 664 piedi di 166 animali provenienti da 9 aziende del Nord Italia ed è stata indagata la presenza di differenze significative nelle prevalenze delle lesioni nelle aziende con almeno 20 scrofe osservate. La prevalenza di scrofe con almeno una lesione è stata del 99,4%, maggiore negli arti posteriori rispetto agli anteriori (56,9% vs 39,9%) e negli unghioni laterali rispetto ai mediali (57,7% vs 39,2%), in linea con quanto riportato in letteratura. Le lesioni più riscontrate sono state le fratture orizzontali della parete (83,1%), seguite da quelle alla linea bianca (61,5%), dalle fratture verticali della parete (47,6%), dalla lunghezza eccessiva degli unghioni (42,8%) e dall'ipercheratosi del tallone (39,8%). Differenze significative nella prevalenza di alcune lesioni sono state riscontrate nelle aziende considerate. L'ampliamento del campione e la valutazione della tipologia di pavimentazione in allevamento consentiranno di approfondire i risultati ottenuti da questo studio, al fine di migliorare la salute del piede e il benessere delle scrofe italiane.

### ABSTRACT

Foot lesions and lameness are considered the second largest reason for the early culling of sows on farm, causing economic and welfare concerns strictly linked with the housing conditions. The aim of this study was to collect data on the prevalence and type of foot lesions in Italian breeding sows. 664 feet of 166 culled sows from 9 farms located in the Northern Italy were evaluated at slaughterhouse. Differences between farms on the prevalence of foot lesions with at least 20 sows were analysed. In accordance with literature, the prevalence of sows with at least one foot lesion was 99,4%, higher on the hind feet than the front feet (56,9% vs 39,9%) and higher on the lateral digits than the medial digits (57,7% vs 39,2%). Horizontal cracked wall (83,1%), white line fracture (61,5%), vertical cracked wall (47,6%), dew claw and heel overgrowth (42,8% and 39,8%) were the most prevalent lesions. Significant differences on the prevalence of foot lesions between farms were found. Increasing the number of farms and evaluating the floor type could help to deepen the results of this study in order to improve the foot health and welfare of Italian sows.

## INTRODUZIONE

Nel contesto della filiera suinicola le scrofe rappresentano una delle categorie maggiormente soggette a problemi locomotori, a causa della lunga vita produttiva e dell'elevato peso (Pluym *et al.*, 2011; Nalon *et al.*, 2013). Le lesioni podali, un riscontro molto frequente caratterizzato da prevalenze che si attestano tra l'88 e il 100% (Nalon *et al.*, 2013), sono state associate ad un peggioramento delle performance riproduttive e ad un rischio aumentato di zoppia, fattori che rappresentano, rispettivamente, la prima e la seconda causa di riforma anticipata o eutanasia in allevamento (Kirk *et al.*, 2005; Engblom *et al.*, 2008). In particolare, lesioni al piede e zoppie costituiscono il 9% della riforma involontaria (Fall *et al.*, 2008; Traulsen *et al.*, 2016; Tinkle *et al.*, 2017), riflettendosi in minore longevità dei gruppi e scarsa produttività, quest'ultima dovuta ad una minore deambulazione per cause algiche, una conseguente diminuzione del consumo di alimento con calo della produzione latte e qualità della nidiata (Knauer *et al.*, 2007; Pluym *et al.*, 2011; Nalon *et al.*, 2013). Oltre alle perdite economiche dovute al costo dei trattamenti terapeutici, la mortalità di ciclo e, nello specifico, la mortalità dei suinetti, costituisce una delle principali cause di mancato reddito negli allevamenti suinicoli ed è stata correlata alla presenza di problemi locomotori nelle scrofe (Dial *et al.*, 1992; Stein *et al.*, 1990).

Il graduale aumento del numero di capi allevati, congiuntamente ad un cambiamento gestionale delle scrofe, passate da sistemi esclusivamente in gabbia ad una stabulazione principalmente libera, ha comportato un aumento dell'incidenza di zoppie (Heinonen *et al.*, 2013) che, determinando dolore e limitazioni nel movimento, sono considerate uno dei principali problemi di benessere animale (Whay *et al.*, 2003), motivo per cui vengono incluse in numerosi protocolli di valutazione del benessere animale come parametro *animal-based* (ABM).

L'eziopatogenesi delle lesioni al piede nelle scrofe e, più in generale, nei suini ha una natura multifattoriale: essa riconosce fattori esterni legati alla tipologia di pavimentazione (ad esempio pavimento pieno, con o senza materiale da lettiera, oppure pavimento fessurato o parzialmente fessurato) (EFSA, 2005), alla sua gestione e a fattori interni riferiti principalmente all'animale (ad esempio genetica, alimentazione, appiombi) (Mouttoutu *et al.*, 1997). Tali fattori possono provocare infiammazioni e/o traumi che alterano l'integrità e lo sviluppo normale degli unghioni e degli unghielli, dando luogo a lesioni anche dolorose (Van Barneveld & Vandeeper, 2008). Sono state sviluppate numerose classificazioni delle lesioni podali che, nella maggior parte dei casi, risultano essere adeguamenti del primo sistema di classificazione descritto da Gjein e Larssen nel 1995 (Bradley *et al.*, 2007; Deen *et al.*, 2009). In letteratura le lesioni podali maggiormente riscontrate nelle scrofe sono le erosioni del tallone, seguite da fratture alla linea bianca, fratture della parete orizzontale e verticale, distacco nella giunzione suola tallone, eccessiva crescita degli unghioni e degli unghielli, ulcere e lesioni della cute (Torrison, 2010; Ossent, 2010; Van Amstel, 2011). Nonostante Dewey *et al.* (1993) abbiano stimato che dal 5 al 20% delle zoppie siano causate da lesioni al piede, la letteratura recente riporta risultati contraddittori al riguardo. Non tutte le lesioni sono associate a dolore e a zoppia, difatti le lesioni podali sono influenzate principalmente dalla loro gravità e localizzazione (Anil *et al.*, 2007; Heinonen *et al.*, 2013). In particolare, quelle che coinvolgono la linea bianca sono state più frequentemente correlate a sintomatologia algica (Anil *et al.*, 2007; Kilbride *et al.*, 2010; Pluym *et al.*, 2011) al contrario di erosioni e lunghezza eccessiva per cui non sono state dimostrate correlazioni significative (Grégoire *et al.*, 2013).

Nonostante la rilevanza del problema a livello internazionale, la letteratura risulta essere particolarmente scarsa, rendendo più complesso lo sviluppo di un'azione mirata sulle strutture e sui sistemi di stabulazione degli allevamenti al fine di migliorare il benessere delle scrofe. In Italia, pochi lavori hanno affrontato la tematica e il recente studio di Sala e collaboratori (2019) ha valutato le lesioni podali delle scrofe in sala parto in relazione al tasso di schiacciamento dei suinetti.

L'obiettivo di questo studio preliminare, oggetto di un progetto di ricerca Ministeriale (PRC 2017/015), è raccogliere dati sulla prevalenza, sulla tipologia e sulla distribuzione delle lesioni al piede delle scrofe italiane.

## **MATERIALI E METODI**

### *Selezione delle aziende*

Lo studio è stato condotto in uno stabilimento di macellazione situato nella pianura padana, che macella ordinariamente suini a fine carriera. Nel mese di dicembre 2019 sono state valutate, mediante campionamento casuale, 9 aziende che conferiscono al macello; 8 allevamenti situati in Lombardia (1 a Brescia e 7 a Lodi) e un centro di raccolta che raccoglie animali provenienti da allevamenti localizzati in tutto il Piemonte.

### *Sviluppo di un protocollo per la valutazione delle lesioni podali nelle scrofe*

È stata sviluppata una check-list per la valutazione visiva delle lesioni podali, che prende in considerazione le alterazioni descritte da Deen e collaboratori (2009), aggiungendo la presenza di fratture della suola (FS), intese come fessure / fratture della suola e di lesioni al cercine coronario (CB), insieme ai diversi gradi di gravità.

Nello specifico, le lesioni osservate sono le seguenti:

- Ipercheratosi ed erosione del tallone (HOE - *Heel Overgrowth and Erosion*): perdita del tessuto molle del tallone, con presenza di depressioni e flap cutanei;
- Separazione suola - tallone (HSC - *Heel-Sole Crack*): presenza di un distaccamento nel punto di giunzione fra la suola e il tallone;
- Frattura della suola (FS): presenza di fratture o fessure della suola;
- Frattura orizzontale della parete (CWH - *Cracked Wall Horizontal*): presenza di emorragie sulla parete dell'unghione e/o fratture orizzontali che attraversano lo spessore della parete;
- Frattura verticale della parete dell'unghione (CWV - *Cracked Wall Vertical*): presenza di fratture verticali sulla parete dell'unghione;
- Linea Bianca (WL - *White Line*): presenza di una linea nera nella *sensitive laminae*, che separa il tessuto corneo duro della parete da quello molle. Piccole fratture superficiali e diagonali della superficie abassiale dell'unghione in prossimità delle WL sono state considerate come WL;
- Lunghezza eccessiva degli unghioni (T - *Toes*) o degli unghielli (DC - *Dew Claws*).

In Tabella 1 sono riportate le descrizioni delle singole lesioni con la relativa gradazione.

### *Raccolta dei dati al macello e applicazione della check-list*

Per ciascuna azienda, sono state valutate da un minimo di 5 ad un massimo di 23 scrofe a fine carriera, per un totale di 166 animali (1328 unghioni e 1328 unghielli). Le zampe di ciascuna scrofa sono state raccolte e numerate singolarmente da due valutatori, dopo il dissanguamento e prima della scuoiatura. Sono state successivamente trasportate presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - Sede Territoriale di Lodi per la valutazione visiva delle lesioni.

Il piede anteriore destro è stato sempre valutato per primo. Per ogni piede è stata considerata la presenza o l'assenza di lesioni e la loro localizzazione (unghione / unghiello laterale o mediale, destro o sinistro) per un totale di 664 zampe.

### *Analisi statistica*

Una scrofa è stata definita "con lesione" se aveva almeno un dito (unghione o unghiello) con una lesione (Mouttotou *et al.*, 1997). La prevalenza di scrofe con lesione al piede (lesioni

complessive e lesioni singole) è stata calcolata rapportando il numero di scrofe con almeno un unghione o unghietto con lesione sul totale di scrofe osservate (166).

La prevalenza di unghioni o unghietti laterali o mediali dei piedi anteriori con almeno una lesione è stata calcolata rapportando il numero di unghioni e unghietti laterali o mediali dei piedi anteriori con lesione in almeno un unghione o unghietto al numero totale di unghioni o unghietti esaminati (664). La prevalenza di unghioni o unghietti laterali o mediali dei piedi posteriori con almeno una lesione è stata calcolata rapportando il numero di unghioni e unghietti laterali o mediali dei piedi posteriori con lesione in almeno un unghione o unghietto al numero totale di unghioni o unghietti esaminati (664).

Per tutte le prevalenze sono stati calcolati gli intervalli di confidenza al 95%. Successivamente, sono stati considerati gli allevamenti con almeno 20 scrofe esaminate ed è stata calcolata la prevalenza di ogni singola lesione, al fine di verificare la presenza di differenze significative tra gli allevamenti; a tale scopo è stato utilizzato il Test Esatto di Fisher, assumendo come ipotesi nulla che le differenze osservate fra le due popolazioni con i dati campionari fossero casuali. Tutte le analisi sono state eseguite con GraphPad Prism 8 (GraphPad® Software Inc. San Diego, CA, USA).

## RISULTATI

Complessivamente, considerando le lesioni podali, le scrofe con almeno una lesione sono state il 99,4%. Le lesioni erano localizzate per il 56,9% a livello di arti posteriori mentre il 39,9% negli arti anteriori. Le lesioni laterali sono state più frequenti rispetto a quelle mediali, sia negli arti anteriori (22,8% vs 17,1%) che in quelli posteriori (34,9% vs 22,1%).

### *Prevalenza delle lesioni singole*

La prevalenza di ogni lesione considerata singolarmente è riportata in Tabella 2. Sulla superficie soleare la lesione più rappresentata è stata l'HOE (39,8%), seguita dalla HSC (38,6%) e dalla FS (9,0%). Le CWH sono state le lesioni della parete più rappresentate (83,1%), seguite dalle WL (61,5%), dalle CWV (47,6%), dalla DC (42,8%) e dalla T (10,2%). Le lesioni CB riscontrate hanno evidenziato una prevalenza del 24,7% negli unghioni e del 3,6% negli unghietti.

### *Distribuzione delle lesioni*

La distribuzione delle lesioni podali, considerate singolarmente, nell'arto anteriore e posteriore, destro e sinistro e nell'unghione mediale e laterale (o unghietto mediale e laterale) è riportata nelle Tabelle 3 e 4. La CWH è stata la lesione di parete più frequente, con una prevalenza compresa fra 22,3% e 33,7%, con le dita laterali più coinvolte rispetto alle mediali. Situazione analoga per la WL, seconda lesione di parete più rappresentata, che è stata riscontrata con una prevalenza compresa fra 11,4% e 30,7%. Per ciò che riguarda la superficie soleare, la lesione più riscontrata è stata l'HOE (5,4%-19,9%), seguita dalla HSC (4,9%-19,3%).

### *Caratteristiche delle lesioni per allevamento*

Delle 9 aziende considerate in questo studio, 3 allevamenti (A, B e C) avevano un numero di scrofe campionate uguale o maggiore a 20 (A= 23, B= 20, C=21). In queste tre aziende è stato possibile osservare un'ampia variabilità nelle prevalenze delle lesioni, in particolar modo per quanto riguarda la CWH (B= 80,0%, C= 100,0%), l'HOE (B= 20,0%, C=71,4%), la WL (A= 60,9%, C= 90,5%), la FS (B= 20%, C= 4,8%), la T (A= 4,3%, C=28,6%) e la DC (B= 75,0%, C= 42,9%). La prevalenza delle singole lesioni nei rispettivi allevamenti è riportata in Tabella 5.

L'analisi statistica ha mostrato differenze significative fra l'allevamento A e B per quello che riguarda la T ( $P=0,005$ ) e DCCB ( $P=0,02$ ), fra l'azienda A e C per l'HOE ( $P=0,02$ ), la WL ( $P=0,04$ ) e fra B e C per ciò che concerne l'HOE ( $P=0,002$ ), CWH ( $P=0,05$ ) e DCCB ( $P=0,02$ ).

## DISCUSSIONE

La prevalenza di animali con almeno una lesione ad unghioni o unghielli si è rivelata molto alta (99,4%), risultato sovrapponibile con i dati riportati in letteratura (Bradley *et al.*, 2007; Pluym *et al.*, 2011). I risultati hanno evidenziato prevalenze maggiori di lesioni a livello di arti posteriori e sugli unghioni laterali, confermando i risultati ottenuti da lavori precedenti (Bradley *et al.*, 2007; Pluym *et al.*, 2011). L'osservazione di prevalenze maggiori a carico degli arti posteriori può essere attribuito ad una fisiologica minore uniformità degli unghioni posteriori (Penny *et al.*, 1963) che porta ad una ineguale distribuzione del peso, fattore fortemente predisponente lo sviluppo di lesioni podali (Kornegay *et al.*, 1990). Inoltre, a tale predisposizione può concorrere anche il contatto diretto di questi con gli escreti derivanti dalla minzione e dalla defecazione, che nel tempo possono portare ad un indebolimento dei tessuti duri della parete (Gjein & Larssen, 1995; Knauer *et al.*, 2007; KilBride *et al.*, 2010). La maggior frequenza di lesioni riscontrate a carico degli unghioni laterali, invece, evidenzia l'impatto di queste strutture, che sorreggono il 78% del peso corporeo (Webb, 1984); motivo per cui sono maggiormente sottoposti a stress, insieme ad una mediamente più ampia area d'appoggio che li predispone ad una vasta gamma di lesioni (Pluym *et al.*, 2011).

In contrasto con studi precedenti, che riportavano la lesione da ipercheratosi ed erosione del tallone come la più frequente in termini assoluti (Mouttoutu *et al.*, 1997; Sala *et al.*, 2019), in questo studio la lesione maggiormente riscontrata (83,1%) è stata la frattura orizzontale della parete. L'ipercheratosi ed erosione del tallone è stata la più rappresentata delle lesioni soltanto a livello soleare con una prevalenza del 39,8%. Questa diversità potrebbe essere stata influenzata dalla tipologia di stabulazione, dalle caratteristiche del campione e dalla sua rappresentatività.

A livello di parete, dopo la frattura orizzontale, la lesione maggiormente rilevata è stata la frattura della linea bianca (61,5%), risultato simile a quello di Mouttoutu e collaboratori (1997), che hanno riportato una prevalenza pari al 55,4%. Occorre tenere presente che, rispetto al metodo di valutazione delle lesioni podali utilizzato nel presente studio (Deen *et al.*, 2007), Mouttoutu e collaboratori (1997) hanno considerato separatamente il distacco di parete (prevalenza dell'11,5%).

Le lesioni ai piedi, pur presentando un'eziologia multifattoriale, sono state frequentemente associate alla tipologia di pavimentazione in allevamento e alle sue caratteristiche fisiche, difatti, scivolosità, abrasività e deterioramento possono rappresentare un importante fattore di rischio (Penny *et al.*, 1965; McKee & Dumelow, 1995), così come l'ampiezza delle aperture del fessurato in calcestruzzo (Webb, 1983).

Le fratture orizzontali della parete e le lesioni alla linea bianca sono state associate ad una pavimentazione parzialmente fessurata, soprattutto se bagnata e quindi scivolosa, in quanto meno capace di sostenere il peso dell'animale in modo uniforme ed in grado di aumentare la pressione in aree più ristrette del piede facilitando l'instaurarsi di lesioni Mouttoutu *et al.*, 1999). Le fratture della parete, tuttavia, aumentano anche in caso di pavimentazione piena con paglia: l'unghia, infatti, si consuma in misura minore e l'allungamento eccessivo modifica l'angolo tra suola e parete rendendolo più acuto e soggetto a maggior pressione (Mouttoutu *et al.*, 1999). L'ipercheratosi con erosione del tallone, invece, si è rivelata essere meno frequente in caso di pavimentazioni piene con paglia, grazie all'effetto protettivo



che la lettiera fornisce al tallone. Al contrario, la sua prevalenza aumenta nel caso di pavimentazioni parzialmente fessurate, dove i travetti portano ad una diminuzione dell'area di contatto tra tallone e terreno per l'ineguale distribuzione della forza peso, eventualmente aggravata da margini scheggiati o consumati (Moultotou *et al.*, 1999).

Le differenze significative riscontrate fra i tre allevamenti possono suggerire l'influenza dei diversi sistemi di stabulazione delle scrofe o di gestione dell'area di decubito, o di altri fattori, come ad esempio l'alimentazione o la genetica (Moultotou *et al.*, 1999; Calderon Diaz *et al.*, 2014). L'aumento della numerosità campionaria e la valutazione delle strutture d'allevamento direttamente in azienda consentiranno di approfondire i risultati ottenuti nel presente studio.

## CONCLUSIONI

Le lesioni podali sono state riscontrate nella quasi totalità delle scrofe valutate nel presente studio. Gli arti posteriori e, più nello specifico, gli unghioni laterali sono risultati essere i più coinvolti. La frattura orizzontale della parete e l'ipercheratosi ed erosione del tallone sono state le lesioni più frequenti in assoluto. Le differenze significative riscontrate in alcune lesioni podali fra gli allevamenti suggeriscono una potenziale influenza delle condizioni di stabulazione delle scrofe nel determinare specifiche lesioni podali.

Il proseguimento dello studio consentirà di individuare e approfondire i principali fattori di rischio dello sviluppo delle singole lesioni podali, indagando l'eventuale presenza di un'associazione fra queste e le caratteristiche della pavimentazione in allevamento, al fine di ridurre i tassi di rimonta dovuti ai problemi locomotori, migliorare la salute del piede e il benessere animale in allevamento.

**Tabella 1.** Tipologia di lesioni podali e relativo livello di gravità (Deen *et al.*, 2009 modificato).

**Table 1.** *Type of foot lesions and scoring system (Deen et al., 2009 modified).*

| OSSERVAZIONI                                                             | SIGLA      | GRADO | CLASSIFICAZIONE                                                                                |
|--------------------------------------------------------------------------|------------|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ipercheratosi ed erosione tallone ( <i>Heel Over-Growth Et Erosion</i> ) | <b>HOE</b> | 1     | Leggera crescita eccessiva e/o erosione superficiale del tallone                               |
|                                                                          |            | 2     | Numerose fratture con evidente eccessiva crescita ed erosione superficiale del tallone         |
|                                                                          |            | 3     | Estesa ed evidente eccessiva crescita ed erosione superficiale del tallone con fratture estese |
| Frattura suola tallone ( <i>Heel-Sole Crack</i> )                        | <b>HSC</b> | 1     | Separazione superficiale a livello di giuntura                                                 |
|                                                                          |            | 2     | Separazione lunga a livello di giuntura                                                        |
|                                                                          |            | 3     | Separazione lunga e profonda a livello di giuntura                                             |
| Frattura della suola                                                     | <b>FS</b>  | 1     | Frattura corta e superficiale della suola                                                      |
|                                                                          |            | 2     | Frattura lunga e superficiale della suola                                                      |
|                                                                          |            | 3     | Frattura profonda della suola                                                                  |

|                                                                                 |             |   |                                                                           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-------------|---|---------------------------------------------------------------------------|
| Frattura orizzontale della parete ( <i>Cracked Wall Horizontal</i> )            | <b>CWH</b>  | 1 | Corta/superficiale frattura della parete orizzontale o emorragie evidenti |
|                                                                                 |             | 2 | Lunga ma superficiale frattura della parete orizzontale                   |
|                                                                                 |             | 3 | Multiple o profonde frattura/e della parete orizzontale                   |
| Frattura verticale della parete ( <i>Cracked Wall Vertical</i> )                | <b>CWV</b>  | 1 | Corta/superficiale frattura della parete verticale                        |
|                                                                                 |             | 2 | Lunga ma superficiale frattura della parete verticale                     |
|                                                                                 |             | 3 | Multiple o profonde frattura/e della parete verticale                     |
| Separazione della linea bianca ( <i>White Line</i> )                            | <b>WL</b>   | 1 | Separazione superficiale e/o corta lungo la linea bianca                  |
|                                                                                 |             | 2 | Separazione lunga lungo la linea bianca                                   |
|                                                                                 |             | 3 | Separazione lunga e profonda lungo la linea bianca                        |
| Lesione del cercine coronario degli unghioni ( <i>Coronary Band</i> )           | <b>CB</b>   | 1 | Corta/superficiale frattura del cercine coronario o emorragie evidenti    |
|                                                                                 |             | 2 | Lunga ma superficiale frattura del cercine coronario                      |
|                                                                                 |             | 3 | Multiple o profonde frattura/e del cercine coronario                      |
| Lesione del cercine coronario degli unghioni ( <i>Dew claws Coronary Band</i> ) | <b>DCCB</b> | 1 | Leggermente più lungo del normale                                         |
|                                                                                 |             | 2 | Unghielli estesi oltre la linea della superficie d'appoggio               |
|                                                                                 |             | 3 | Unghiello torto e/o parzialmente mancante                                 |
| Lunghezza eccessiva degli unghioni ( <i>Toes</i> )                              | <b>T</b>    | 1 | Una o più dita leggermente più lunghe del normale                         |
|                                                                                 |             | 2 | Una o più dita significativamente più lunghe del normale                  |
|                                                                                 |             | 3 | Una o più dita tanto lunghe da poter inficiare la normale locomozione     |
| Lunghezza eccessiva degli unghielli ( <i>Dew Claws</i> )                        | <b>DC</b>   | 1 | Leggermente più lungo del normale                                         |
|                                                                                 |             | 2 | Unghielli estesi oltre la linea della superficie d'appoggio               |
|                                                                                 |             | 3 | Unghiello torto e/o parzialmente mancante                                 |

**Tabella 2.** Prevalenza delle lesioni podali con almeno un unghione o unghiello coinvolto nelle 166 scrofe valutate.

**Table 2.** Number and percentage prevalence of feet with at least one digit affected of 166 sows.

| Lesione     | Numero | %    | IC*       |
|-------------|--------|------|-----------|
| <b>HOE</b>  | 66     | 39,8 | 46,0-31,1 |
| <b>HSC</b>  | 64     | 38,6 | 47,2-32,3 |
| <b>FS</b>   | 15     | 9,0  | 13,4-4,7  |
| <b>CWH</b>  | 138    | 83,1 | 88,8-77,4 |
| <b>CWV</b>  | 79     | 47,6 | 55,2-40,0 |
| <b>WL</b>   | 102    | 61,5 | 68,9-54,0 |
| <b>CB</b>   | 41     | 24,7 | 31,3-18,1 |
| <b>DCCB</b> | 6      | 3,6  | 6,5-0,8   |
| <b>T</b>    | 17     | 10,2 | 14,1-5,1  |
| <b>DC</b>   | 71     | 42,8 | 50,3-35,2 |
| <b>Tot.</b> | 165    | 99,4 | 98,2-100  |

HOE = Ipercheratosi ed erosione del tallone; HSC = Separazione suola - tallone; FS = Frattura della suola; CWH = Fratture orizzontali della parete dell'unghione; CWV = Fratture verticali della parete dell'unghione; WL = Lesione della linea Bianca; CB = Lesione al cercine coronario degli unghioni; DCCB = Lesione al cercine coronario degli unghielli; T = Eccessiva crescita degli unghioni; DC = Eccessiva crescita degli unghielli; IC\* = Intervallo di confidenza al 95%; Tot.= almeno una lesione

**Tabella 3.** Numero e percentuale della prevalenza delle lesioni podali nelle dita laterali e mediali del piede anteriore sinistro e destro di 166 scrofe.

**Table 3.** Number and percentage prevalence of foot lesions in the lateral and medial digits of the left and right front feet of 166 sows.

| Lesione             | PIEDE SINISTRO |      |              |              |      |              | PIEDE DESTRO  |      |              |              |      |              |
|---------------------|----------------|------|--------------|--------------|------|--------------|---------------|------|--------------|--------------|------|--------------|
|                     | Dito laterale  |      |              | Dito mediale |      |              | Dito laterale |      |              | Dito mediale |      |              |
|                     | N              | %    | 95% IC*      | N            | %    | 95% IC*      | N             | %    | 95% IC*      | N            | %    | 95% IC*      |
| <i>Sup. soleare</i> |                |      |              |              |      |              |               |      |              |              |      |              |
| <b>HOE</b>          | 16             | 9,6  | 14,13-5,15   | 9            | 5,4  | 8,87-1,98    | 12            | 7,2  | 11,17-3,29   | 12           | 7,2  | 11,17-3,29   |
| <b>HSC</b>          | 8              | 4,8  | 8,08-1,56    | 9            | 5,4  | 8,87-1,98    | 14            | 8,4  | 12,66-4,21   | 16           | 9,6  | 14,13-5,15   |
| <b>FS</b>           | 2              | 1,2  | 2,86-(-0,45) | 3            | 1,8  | 3,83-(-0,22) | 4             | 2,4  | 4,74-0,08    | 3            | 1,8  | 3,83-(-0,22) |
| <i>Parete</i>       |                |      |              |              |      |              |               |      |              |              |      |              |
| <b>CWH</b>          | 38             | 22,9 | 29,28-16,50  | 37           | 22,3 | 28,62-15,96  | 48            | 28,9 | 35,81-22,02  | 43           | 25,9 | 32,57-19,24  |
| <b>CWV</b>          | 11             | 6,6  | 10,41-2,84   | 14           | 8,4  | 12,66-4,21   | 14            | 8,4  | 12,66-11,17  | 10           | 6,0  | 9,64-2,40    |
| <b>WL</b>           | 36             | 21,7 | 27,96-15,42  | 23           | 13,9 | 19,11-8,60   | 28            | 16,9 | 22,56-11,17  | 19           | 11,4 | 16,29-6,60   |
| <b>CB</b>           | 11             | 6,6  | 10,41-2,84   | 2            | 1,20 | 2,86-(-0,45) | 17            | 10,2 | 14,85-5,63   | 6            | 3,6  | 6,45-0,78    |
| <b>T</b>            | 0              | 0,0  | 0,00-0,00    | 3            | 1,81 | 3,83-(-0,22) | 0             | 0,0  | 0-0          | 1            | 0,6  | 1,78-0,57    |
| <i>Unghielli</i>    |                |      |              |              |      |              |               |      |              |              |      |              |
| <b>DC</b>           | 21             | 12,7 | 17,71-7,59   | 8            | 4,82 | 8,08-1,56    | 22            | 13,3 | 18,41-8,09   | 8            | 4,8  | 8,08-1,56    |
| <b>DCCB</b>         | 0              | 0,0  | 0,00-0,00    | 0            | 0,00 | 0-0          | 1             | 0,6  | 1,78-(-0,57) | 1            | 0,6  | 1,78-(-0,57) |

HOE = Ipercheratosi ed erosione del tallone; HSC = Separazione suola - tallone; FS = Frattura della suola; CWH = Fratture orizzontali della parete dell'unghione; CWV = Fratture verticali della parete dell'unghione; WL = Lesione della linea Bianca; CB = Lesione al cercine coronario degli unghioni; DCCB = Lesione al cercine coronario degli unghielli; T = Eccessiva crescita degli unghioni; DC = Eccessiva crescita degli unghielli; IC\* = Intervallo di confidenza al 95%.

**Tabella 4.** Numero e percentuale della prevalenza delle lesioni podali nelle dita laterali e mediali del piede posteriore sinistro e destro di 166 scrofe.

**Table 4.** Number and percentage prevalence of foot lesions in the lateral and medial digits of the left and right hind feet of 166 sows.

| Lesione             | PIEDE SINISTRO |      |            |              |      |            | PIEDE DESTRO  |      |            |              |      |            |
|---------------------|----------------|------|------------|--------------|------|------------|---------------|------|------------|--------------|------|------------|
|                     | Dito laterale  |      |            | Dito mediale |      |            | Dito laterale |      |            | Dito mediale |      |            |
|                     | N              | %    | 95% IC*    | N            | %    | 95% IC*    | N             | %    | 95% IC*    | N            | %    | 95% IC*    |
| <i>Sup. soleare</i> |                |      |            |              |      |            |               |      |            |              |      |            |
| <b>HOE</b>          | 33             | 19,9 | 26,0-13,8  | 11           | 6,6  | 10,4-2,8   | 30            | 18,1 | 23,9-12,2  | 11           | 6,6  | 10,4-2,8   |
| <b>HSC</b>          | 82             | 19,3 | 25,3-13,3  | 12           | 7,2  | 11,2-3,3   | 32            | 19,3 | 25,3-13,3  | 16           | 9,6  | 14,1-5,2   |
| <b>FS</b>           | 2              | 1,2  | 2,9-(-0,5) | 3            | 1,8  | 3,8-(-0,2) | 2             | 1,2  | 2,9-(-0,5) | 2            | 1,2  | 2,9-(-0,5) |
| <i>Parete</i>       |                |      |            |              |      |            |               |      |            |              |      |            |
| <b>CWH</b>          | 56             | 33,7 | 40,9-26,5  | 37           | 22,3 | 28,6-16,0  | 46            | 27,7 | 34,5-20,9  | 41           | 24,7 | 31,3-18,1  |
| <b>CWV</b>          | 21             | 12,7 | 17,7-7,6   | 20           | 12,0 | 17,0-7,1   | 22            | 13,3 | 18,4-8,1   | 17           | 10,2 | 14,9-5,6   |
| <b>WL</b>           | 51             | 30,7 | 37,7-23,7  | 22           | 13,3 | 18,4-8,1   | 44            | 26,5 | 32,2-19,8  | 25           | 15,1 | 20,5-9,6   |
| <b>CB</b>           | 7              | 4,2  | 7,3-1,2    | 3            | 1,8  | 3,8-(-0,2) | 8             | 4,8  | 8,1-1,6    | 5            | 3,0  | 5,6-0,4    |
| <b>T</b>            | 6              | 3,6  | 6,5-0,8    | 3            | 1,8  | 3,8-(-0,2) | 10            | 6,0  | 9,6-2,4    | 6            | 3,6  | 6,4-0,8    |
| <i>Unghielli</i>    |                |      |            |              |      |            |               |      |            |              |      |            |
| <b>DC</b>           | 27             | 16,3 | 21,9-10,7  | 28           | 16,9 | 22,6-11,2  | 32            | 19,3 | 25,3-13,3  | 28           | 16,9 | 22,6-11,2  |
| <b>DCCB</b>         | 0              | 0,0  | 0-0        | 2            | 1,2  | 2,9-(-0,5) | 2             | 1,2  | 2,9(0,5)   | 1            | 0,6  | 1,8-(-0,6) |

HOE = Ipercheratosi ed erosione del tallone; HSC = Separazione suola - tallone; FS = Frattura della suola; CWH = Fratture orizzontali della parete dell'unghione; CWV = Fratture verticali della parete dell'unghione; WL = Lesione della linea Bianca; CB = Lesione al cercine coronario degli unghioni; DCCB = Lesione al cercine coronario degli unghielli; T = Eccessiva crescita degli unghioni; DC = Eccessiva crescita degli unghielli; IC\* = Intervallo di confidenza al 95%.

**Tabella 5.** Prevalenza delle lesioni podali in scrofe con almeno un unghione o unghietto coinvolto nelle 3 aziende con più di 20 scrofe valutate.

**Table 5.** Number and percentage prevalence of foot lesions with at least one digit affected of 3 farms with more than 20 sows observed.

| Lesione %   | Azienda |             |      |             |       |             |
|-------------|---------|-------------|------|-------------|-------|-------------|
|             | A       | 95% IC*     | B    | 95% IC*     | C     | 95% IC*     |
| <b>HOE</b>  | 34,8    | 54,2-15,3   | 20,0 | 37,5-2,5    | 71,4  | 90,8-52,1   |
| <b>HSC</b>  | 30,4    | 49,2-11,6   | 35,0 | 55,9-14,1   | 47,6  | 69,0-26,3   |
| <b>FS</b>   | 8,7     | 20,2-(-2,8) | 20,0 | 37,5-2,5    | 4,8   | 13,9-(-4,6) |
| <b>CWH</b>  | 87,0    | 100,7-73,2  | 80,0 | 97,5-62,5   | 100,0 | 100,0-100,0 |
| <b>CWV</b>  | 60,9    | 80,8-40,9   | 65,0 | 85,9-44,1   | 61,9  | 82,7-41,1   |
| <b>WL</b>   | 60,9    | 80,8-40,9   | 85,0 | 100,6-69,4  | 90,5  | 103,0-77,9  |
| <b>CB</b>   | 30,4    | 49,2-11,6   | 45,0 | 66,8-23,2   | 28,6  | 47,9-9,2    |
| <b>DCCB</b> | 0,0     | 0,0-0,0     | 25,0 | 44,0-6,0    | 0,0   | 0,0-0,0     |
| <b>T</b>    | 4,3     | 12,7-(-4,0) | 5,0  | 14,6-(-4,6) | 28,6  | 47,9-9,2    |
| <b>DC</b>   | 56,5    | 76,8-36,3   | 75,0 | 94,0-56,0   | 42,9  | 64,0-21,7   |

HOE = Ipercheratosi ed erosione del tallone; HSC = Separazione suola - tallone; FS = Frattura della suola; CWH = Fratture orizzontali della parete dell'unghione; CWV = Fratture verticali della parete dell'unghione; WL = Lesione della linea Bianca; CB = Lesione al cercine coronario degli unghioni; DCCB = Lesione al cercine coronario degli unghielli; T = Eccessiva crescita degli unghioni; DC = Eccessiva crescita degli unghielli; IC\* = Intervallo di confidenza al 95%.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anil S.S., Anil L., Deen J. (2007) "Factors associated with claw lesions in gestating sows". *J Swine health prod.* 15, 78-83.
2. Bradley C.L., Frank J.W., Maxwell C.V., Johnson Z.B., Powell J.G., Van Amstel S.R., Ward T.L. (2007) "Characterization of Claw Lesions Associated with Lameness in the University of Arkansas Sow Herd". Arkansas Animal Science Department Report, 106–110.
3. Calderon Diaz J.A.C., Fahey A.G., Boyle L.A. (2014) "Effects of gestation housing system and floor type during lactation on locomotory ability; body, limb, and claw lesions; and lying-down behavior of lactating sows". *J Anim Sci.* 92, 1673-1683.
4. Deen J., Schutttert M., Van Amstel S., Ossent P., Van Barneveld R. (2009) "Feet First from Zinpro: Lesion Scoring Guide". Zinpro Corporation, Eden Prairie, MN, USA.
5. Dewey C.E., Friendship R.M., Wilson M.R. (1993) "Clinical and postmortem examination of sows culled for lameness". *Can Vet J.* 34, 555-556.
6. Dial G.D., Marsh W.E., Polson D.D., Vaillacourt J.P. (1992) "Reproductive failure: differential diagnosis" in: Leman A.I., Straw B.E., Mengeling W.L., D'Allaire S., Taylor D.J. "Diseases of Swine", 7a ed., Iowa State University Press, Ames, 88-137.
7. EFSA (European Food Safety Authority) (2005) "Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types". *The EFSA J.* 268, 1-19.
8. Engblom L., Lundeheim N., Strandberg E., Schneider Mdel P., Dalin A.M., Andersson K. (2008) "Factors affecting length of productive life in Swedish commercial sows". *J Anim Sci.* 86(2), 432-41.
9. Fall N., Gröhn Y., Forslund K., Essen-Gustafsson B., Niskanen R., Emanuelson U. (2008) "An observational study on early-lactation metabolic profiles in Swedish organically and conventionally managed dairy cows". *J Dairy Sci.* 91, 3983–3992.
10. Gjein H., Larssen R.B. (1995) "Housing of pregnant sows in loose and confined systems, a field study. Claw lesions: morphology, prevalence, location and relation to age". *Acta Vet Scand.* 36(4), 433–442.
11. Grégoire J., Bergeron R., D'Allaire S., Meunier-Salaün M.C., Devillers N. (2013) "Assessment of lameness in sows using gait, footprints, postural behavior and foot lesion analysis". *Animal* 7, 1163–1173.
12. Heinonen M., Peltoniemi O., Valros A. (2013) "Impact of lameness and claw lesions in sows on welfare, health and production". *Livest. Sci.* 156, 2-9.
13. KilBride A.L., Gillman C.E., Green L. (2010) "A cross-sectional study of prevalence and risk factors for foot lesions and abnormal posture in lactating sows on commercial farms in England". *Anim Welf.* 19(4), 473-480.
14. Kirk R.K., Svensmark B., Ellegaard L.P., Jensen H.E. (2005) "Locomotive disorders associated with sow mortality in Danish pig herds". *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 52(8), 423-8.
15. Kornegay E. T., Bryant K. L., Notter D. R. (1990) "Toe lesion development in gilts and sows housed in confinement as influenced by toe size and toe location". *J Appl Agric Res.* 5, 327-334.
16. Knauer M., Stalder K.J., Karriker L., Baas T.J., Johnson C., Serenius T., Layman, L., McKean, J.D. (2007) "A descriptive survey of lesions from cull sows harvested at two Midwestern U.S. facilities". *Prev Vet Med.* 82, 198–212.
17. McKee C. I., Dumelow J. (1995) "A review of the factors involved in developing effective non-slip floors for pigs". *J Agr Eng Res.* 60, 35-42.
18. Mouttotou N., Hatchell F., Lundervold M., Green L. (1997). "Prevalence and distribution

- of foot lesions in finishing pigs in south-west England". *Vet rec.* 141, 115-20.
19. Mouttoton N., Hatchell F., Green L. (1999) "Foot lesions in finishing pigs and their associations with the type of floor". *Vet rec.* 144, 629-32.
  20. Nalon E., Conte S., Maes D., Tuytens F., Deviller N. (2013) "Assessment of lameness and claw lesions in sows" *Livest Sci.* 156(1-3), 10-23.
  21. Ossent, P. (2010) "An introduction to sow lameness, claw lesions and pathogenesis theories" in: Zinpro Corporation "FeetFirst Zinpro Corporation", Eden Prairie, MN, USA, 1-44.
  22. Penny R.H.C., Osborne A.D., Wright A.I. (1963) "The causes and incidence of lameness in store and adult pigs". *Vet Rec.* 75, 1225-1235.
  23. Penny R. H., Osborne A. D., Wright A. I., Stephens T. K. (1965). Foot-rot in pigs: Observations on the clinical disease. *Vet Rec.* 77, 1101-1108.
  24. Pluym L., Van Nuffel A., Dewulf J., Cools A., Vangroenweghe F., Van Hoorebeke S., Maes D. (2011) "Prevalence and risk factors of claw lesions and lameness in pregnant sows in two types of group housing". *Vet Med (Praha)*. 56, 101-109.
  25. Sala V., Gusmara C., Zolin C., Costa A. (2019) "Piglets crushing rate related to sow foot lesions in the farrowing room". *Large Anim Rev.* 25, 55-60.
  26. Stein T.E., Duffy S.J., Wickstrom S. (1990) "Differences in production values between high and low productivity swine breeding herds". *Anim Sci.* 68, 3972-3979.
  27. Tinkle A. K., Duberstein K. J., Wilson M. E., Parsley M. A., Beckman M. K., Torrison J., Azain M. J., Dove C. R. (2017) "Functional claw trimming improves the gait and locomotion of sows". *Livest Sci.* 195, 53-57.
  28. Torrison J. (2010) "Sow claw lesion pathology". FeetFirst® Sow lameness Symposium II, Minneapolis, MN, USA, 29-40.
  29. Traulsen I., Breitenberger S., Auer W., Stamer E., Müller K., Krieter J. (2016) "Automatic detection of lameness in gestating group-housed sows using positioning and acceleration measurements". *Animal*. 10 (6), 970-977.
  30. <http://www.archief.verantwoordeveehouderij.nl/Netwerken/Enquete/ZeugenKlauwencheck/Klauwencheck.pdf>S (visualizzato il 16.12.2019).
  31. Van Amstel S. (2011) "Questions and answers around sow claw trimming". *PigProgress*. 27(10), 12-13.
  32. Van Barneveld R., Vandeppeer M. (2008) "The role of nutrition in sow foot health". Proceedings of the Zinpro Feet First Symposium, Minneapolis, Minnesota, USA, 27-42.
  33. Webb N. G., Nilsson C. (1983) "Flooring and injury—an overview". In: Baxter S.H., Baxter M.R., McCormack J.A.C. "Farm Animal Housing and Welfare" Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers Group, 129-136.
  34. Webb N.G. (1984) "Compressive stresses on, and the strength of, the inner and outer digits of pig's feet and the implications for injury and floor design" *J Agric Eng Res.* 30, 71-80
  35. Whay H.R., Main D.C.J., Green L.E., Webster A.J.F. (2003) "Animal-based measures for the assessment of welfare state of dairy cattle, pigs and laying hens: consensus of expert opinion". *Anim Welf.* 12, 205-217.





# **INNOVATIVI SISTEMI DI VALUTAZIONE DELLO STRESS NELLA SCROFA ALL'INTERNO DI DIVERSE TIPOLOGIE DI GABBIE PARTO E LORO IMPATTO SULLA MORTALITA' PRE-SVEZZAMENTO**

## ***INNOVATIVE SOW STRESS ASSESSMENT SYSTEMS WITHIN DIFFERENT TYPES OF BIRTH CAGES AND THEIR IMPACT ON PRE-WEANING MORTALITY***

ROMANO G.<sup>1</sup>, BRESCIANI C.<sup>2</sup>, PRANDI A.<sup>3</sup>, COMIN A.<sup>3</sup>, RIGHI F.<sup>2</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>,  
MAZZONI C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Swivet Research, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia*

<sup>2</sup> *Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, 43121 Parma, Italia*

<sup>3</sup> *Dipartimento di Scienze AgroAlimentari, Ambientali e Animali, Università di Udine,  
33100 Udine, Italia*

**Parole chiave:** gabbie parto, benessere scrofa, mortalità pre-svezzamento

**Key words:** farrowing cages, sow welfare, pre-weaning mortality

### **RIASSUNTO**

L'attenzione delle filiere verso un sistema di allevamento più sensibile al benessere dell'animale, è certamente la sfida del nostro tempo. Ottemperare a questo requisito partendo già dalla sala parto diventa un obiettivo al quale l'azienda suinicola moderna deve volgere lo sguardo. Lo scopo di questo studio è stato di valutare come differenti tipologie di gabbie parto possano influenzare il benessere della scrofa e la mortalità pre-svezzamento. Lo studio ha coinvolto gabbie convenzionali (n=50), gabbie con meccanismo "up and down" (n=48), gabbie con scivolo (n=38) e gabbie aperte con pavimento in plastica (n=36) o in acciaio (n=41). Sono stati effettuati prelievi di sangue nelle scrofe in ingresso e in uscita dalla sala parto, per valutare i valori di cortisolo, DHEA e cortisolo/DHEA, ed è stata registrata la mortalità in lattazione. I risultati ottenuti hanno rilevato un livello medio di cortisolemia inferiore nella gabbia aperta con pavimento in plastica, sottolineando un minor carico allostatico nella scrofa e, quindi, un maggior benessere animale. L'analisi della mortalità ha invece evidenziato una significatività a favore della gabbia con meccanismo "up and down", soprattutto relativa alla mortalità per schiacciamento. La gabbia ideale sarebbe quindi una via di mezzo tra queste due tipologie di gabbie parto, poiché permetterebbe di soddisfare sia le richieste del consumatore che quelle dell'allevatore. Ulteriori approfondimenti sono comunque necessari per la valutazione della resilienza e del carico allostatico delle scrofe in lattazione alloggiate nelle diverse tipologie di gabbie parto.

### **ABSTRACT**

The attention of the supply chains towards a breeding system more sensitive to the welfare of the animal, is certainly the challenge of our time. Meeting this requirement from the delivery room becomes a goal to which the modern pig company must look.. The aim of this study was to evaluate how different types of farrowing cages can influence sow welfare and pre-weaning mortality, so as to find the best compromise between consumer and breeder. The study involved conventional cages (n=50), cages with an "up and down" mechanism (n=48), cages with a slide (n=38) and open cages with a plastic (n=36) or steel floor (n=41). Blood samples were taken from the sows entering and leaving the farrowing room to evaluate the

values of cortisol, DHEA and cortisol / DHEA, and lactation mortality was recorded. The results obtained revealed a lower average level of cortisolemia in the open cage with a plastic floor, emphasizing a lower allostatic load in the sow and, therefore, a greater animal welfare. The analysis of mortality has instead shown a significance in favour of the cage with “up and down” mechanism, especially relating to crush mortality. The ideal cage would therefore be a middle ground between these two types of farrowing cages, since it would allow to satisfy both the consumer and the breeder’s requests. Further details are however necessary for the evaluation of the resilience and the allostatic load of the lactating sows housed in the different types of farrowing cages.

## INTRODUZIONE

Oggigiorno la sala parto rappresenta la chiave della produzione suinicola intensiva e le pressioni sul benessere animale da parte delle filiere diventano sempre più consistenti. L’aspettativa futura, infatti, è che le scrofe rimangano libere durante l’intero periodo di lattazione, come già accade in Norvegia, Svezia e Svizzera (Weber et al., 2009). In Italia, però, la maggior parte degli allevamenti alloggia le scrofe all’interno di gabbie parto, facendole entrare circa una settimana prima del parto e svezzandole dopo 21-28 giorni di lattazione, per una permanenza totale di più di un mese.

Sicuramente le gabbie parto presentano numerosi vantaggi, quali un’ottimizzazione dello spazio, un intervento sulla scrofa più pratico e sicuro per l’operatore (es: trattamenti terapeutici e/o vaccinali) e una migliore gestione delle deiezioni, garantendo un ambiente pulito e igienico anche ai suinetti (Barnett et al., 2001; Rantzer e Svendsen, 2001). Inoltre, la decisione di limitare i movimenti della scrofa durante il parto e la lattazione risale al 1960, con lo scopo principale di ridurre lo schiacciamento dei suinetti (Jarvis et al., 2005; Ostovic et al., 2012). Il confinamento in gabbia, però, rappresenta un fattore stressante per la scrofa, che potrebbe reagire aggredendo i propri suinetti (Danholt et al., 2011; Tummaruk et al., 2017) o non rispondere alle loro urla in caso di schiacciamento (Ringgenberg et al., 2012). Dal punto di vista del benessere, infatti, la gabbia parto non è il luogo ideale dove alloggiare una scrofa, in quanto limita fortemente il suo comportamento naturale, come la costruzione del nido o l’interazione positiva con la sua prole (Damm e Pedersen, 2000). Il termine “stress” venne utilizzato per la prima volta da Selye (1936), facendo riferimento alla “sindrome di adattamento generale” e identificando gli stimoli che alterano l’omeostasi di un organismo come “fattori di stress”. Un cambiamento ambientale acuto, come può essere il passaggio dall’alloggiamento in box, dove la scrofa è libera di muoversi, alla gabbia parto, dove i suoi movimenti sono limitati, rappresenta un fattore stressante di tipo ecologico (Skarlandtová et al., 2012), in grado di innescare nella scrofa un complesso di reazioni fisiologiche, endocrine, metaboliche e comportamentali, la così detta risposta allo stress, al fine di mantenere l’organismo in uno stato di omeostasi (Greenberg et al. 2002, Möstl and Palme 2002).

Nelle scrofe in sala parto, la valutazione della resilienza, ovvero la capacità di un sistema di adattarsi al cambiamento (Wieland e Wallenburg, 2013), e dell’allostasi, ovvero la capacità di mantenere la stabilità dei sistemi fisiologici per mezzo del cambiamento<sup>1</sup>, può essere utilizzata per migliorare il loro stato di benessere. La resilienza e il carico allostatico possono essere valutati attraverso dei marcatori biologici, come il cortisolo, fondamentale indicatore di carico allostatico nel suino (Barnett et al., 1996; Möstl e Palme, 2002), il deidroepiandrosterone (DHEA; McEwen, 2003; Peric et al., 2017), indicatore di resilienza, e il loro rapporto (Logan e Barksdale, 2008; Saczawa et al., 2013).

Il DHEA è un ormone steroideo che agisce su più livelli: svolge un ruolo nell’attivazione del sistema immunitario, possiede effetti antinfiammatori e proprietà antiossidanti ed è coinvolto

---

1 <https://it.wikipedia.org/wiki/Allostasi>

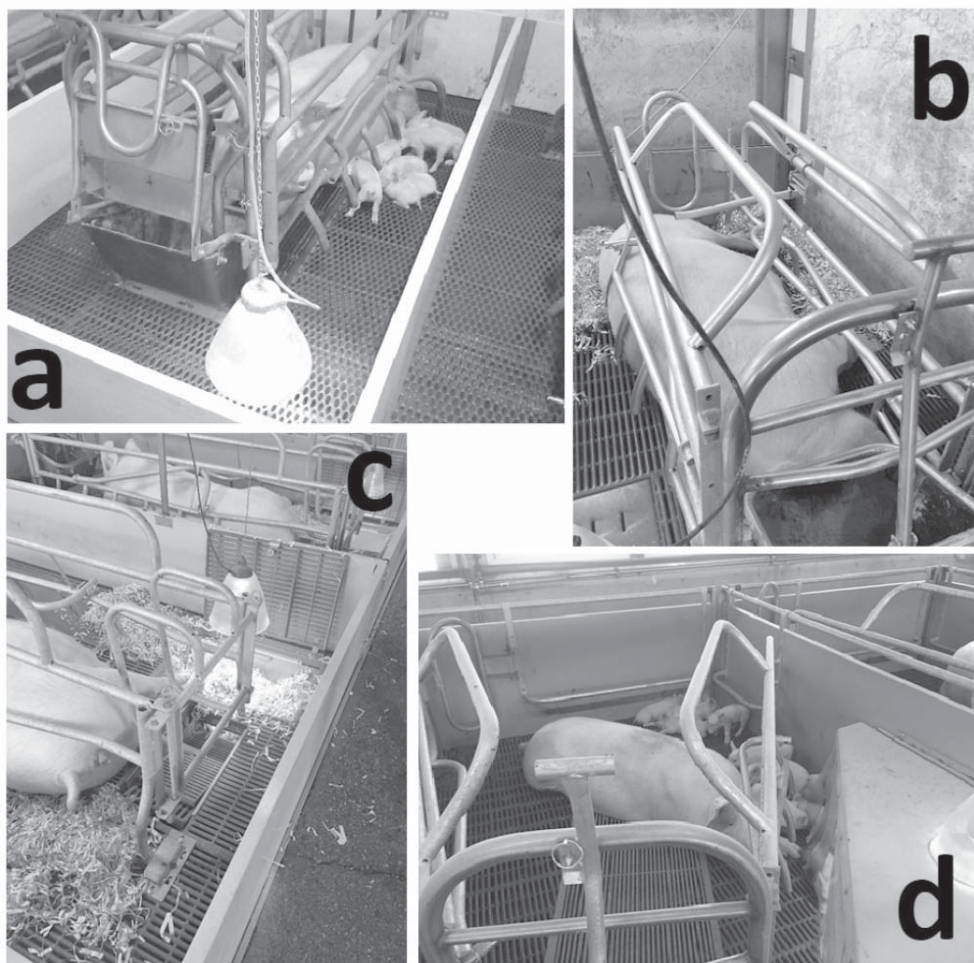
nel metabolismo lipidico. Ridotte concentrazioni di DHEA possono essere associate a diverse patologie, così come, nell'uomo, un'alta concentrazione dello stesso ormone può essere correlata ad un "coping positivo" (Russo et al., 2012), ovvero un insieme di meccanismi psicologici adattativi messi in atto da un individuo per fronteggiare problemi emotivi ed interpersonali, allo scopo di gestire, ridurre o tollerare lo stress ed il conflitto (Snyder, 1999). Charney (2004), infatti, nei suoi studi effettuati sull'uomo, riporta associazioni positive tra le concentrazioni plasmatiche di DHEA e l'adattamento allo stress estremo. Un deterioramento delle condizioni ambientali, invece, corrisponde ad un aumento del rapporto cortisolo/DHEA e alcuni autori (Charney, 2004; Russo et al., 2012) hanno sostenuto l'ipotesi che il DHEA o il rapporto cortisolo/DHEA possano rappresentare un fattore di resilienza e, quindi, prevenire potenziali effetti negativi legati allo stress. A conferma di ciò, Russo et al. (2012) hanno constatato che, nell'uomo, il DHEA contrasta le azioni del cortisolo esercitando effetti antiossidanti e antiinfiammatori e che una concentrazione di DHEA più elevata, o un rapporto cortisolo/DHEA più basso, mitigano i possibili effetti deleteri che alte concentrazioni di cortisolo potrebbero causare a livello cerebrale in persone affette da un disturbo post-traumatico da stress. Il DHEA, inoltre, si è dimostrato avere un effetto positivo sull'apprendimento e sulla memoria (Skarlandtová et al., 2012). Tutti i mammiferi, infatti, tentano di rispondere alle sfide ambientali, fisiche e psicosociali attraverso una valutazione continua dei bisogni e un adattamento del proprio stato fisiologico (Bergamin et al., 2019), e, in questo scenario, l'apprendimento e la memoria giocano un ruolo fondamentale. In base a tutto ciò, quindi, il rapporto cortisolo/DHEA potrebbe essere considerato un ottimo candidato come marker di resilienza per gli animali.

Dato che la suinicoltura moderna Europea, ha ormai fra i suoi scopi dichiarati il rispetto del benessere animale, senza però tralasciare l'aspetto produttivo ed economico, che da sempre contraddistingue questo settore, il presente studio mira a valutare come e se i valori di cortisolo, DHEA e il rapporto cortisolo/DHEA nella scrofa in lattazione varino in funzione della tipologia di gabbia parto utilizzata, così come il numero di suinetti schiacciati nel corso dell'intera lattazione. L'obiettivo dello studio è cercare di individuare, qualora esista, il tipo di gabbia parto più adatto per il benessere della scrofa e la sopravvivenza dei suinetti, senza tralasciare la produttività per l'allevatore, o comunque di trovare il miglior compromesso tra i due.

## **MATERIALI E METODI**

Lo studio è stato condotto in provincia di Brescia, presso un sito 1 di circa 2000 scrofe danesi (Dan Bred International®, Denmark) organizzata in banda settimanale. Al momento della prova l'allevamento è stato considerato "convenzionale" e stabile dal punto di vista sanitario, in particolare per quanto riguarda il virus della PRRS (*Porcine reproductive and respiratory syndrome*) e *Mycoplasma Hyopneumoniae*. 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 di tipo liquido, distribuita in modo automatico in gestazione e semiautomatico in lattazione; le sale parto presentano una temperatura variabile tra i 18 e i 23°C e il sistema di ventilazione è a pressione negativa.

Lo studio è stato effettuato tra gennaio e luglio 2018 (6 mesi) e ha compreso 213 scrofe pluripare e relative nidiate, per un totale di 3.328 suinetti. Le primipare sono state escluse dallo studio perché il loro comportamento in sala parto è più imprevedibile rispetto alle pluripare, mancando di una simile esperienza pregressa (Roelofs et al., 2019). La scrofaia dispone di 5 diverse tipologie di gabbie parto (figura 1), che sono state tutte utilizzate per lo svolgimento della prova: gabbia convenzionale, gabbia con meccanismo "up and down", gabbia con scivolo e gabbia aperta con pavimentazione in plastica (aperta P) o in acciaio (aperta A).



**Figura 1.** Diversi tipi di gabbia parto: convenzionale (a), con meccanismo “up and down” (b), con scivolo (c), aperta (d).

**Figure 1.** Different type of farrowing cage: conventional (a), “up and down” designed (b), slide cage (c), open cage (d).

La gabbia convenzionale (2700×1700 mm; figura 1a) è il tipo di gabbia parto ancora oggi più utilizzato negli allevamenti intensivi, poiché permette una grande ottimizzazione dello spazio in sala parto e una facile gestione delle deiezioni.

La gabbia con meccanismo “up and down” (2700×1700 mm; figura 1b) è caratterizzata dalla presenza di un sensore meccanico, identificabile nella foto come un’asta di colore giallo posizionata sopra la scrofa, che si attiva nel momento in cui la scrofa passa da una posizione sdraiata ad una eretta, innescando l’innalzamento della sola area della scrofa di circa 20 cm dal terreno. Quando la scrofa si sdraia nuovamente il sensore meccanico non rileva più la sua presenza e l’area della scrofa si riabbassa per tornare allo stesso livello del pavimento. Questa nuova tipologia di gabbia parto, di prezzo superiore alla convenzionale, prevede sempre il contenimento della scrofa ma con un maggior riguardo per i suinetti, al fine di limitare la mortalità per schiacciamento in lattazione.

La gabbia parto con scivolo (2600×1800 mm; figura 1c) è caratterizzata dalla presenza di un nido in acciaio posizionato posteriormente e lateralmente alla scrofa, ad un livello inferiore rispetto al pavimento della gabbia stessa. Il nido è provvisto di carta e riscaldato da una lampada a infrarossi, in modo da accogliere i nuovi nati, espulsi dalla scrofa direttamente su un piano inclinato (scivolo) che si collega al nido, nel modo più confortevole possibile. I suinetti, una volta asciugati e riscaldati, potranno risalire degli appositi gradini per andare ad alimentarsi dalla madre. Anche questa nuova tipologia di gabbia parto, di costo intermedio tra le precedenti, prevede il contenimento della scrofa, ma, in questo caso, mira a ridurre la mortalità dei suinetti per ipotermia subito dopo il parto.

Infine, la gabbia parto aperta, delle dimensioni di 2750×1950 mm (figura d), ha una conformazione simile alla gabbia convenzionale, con però la possibilità di sganciare posteriormente i divisori della gabbia e fissarli alla parete del box. In questo modo la scrofa ha la possibilità di muoversi liberamente all'interno del box stesso, senza essere confinata alla sola "area scrofa", presente invece nelle altre tre tipologie di gabbie parto. I suinetti possiedono il loro nido coperto, visibile nella foto in basso a destra, e riscaldato da lampada infrarossi, con all'interno un tappetino che può essere riscaldato o meno. La pavimentazione della gabbia, invece, può essere in plastica oppure in acciaio. Grazie a questa tipologia di gabbia parto la scrofa ha una maggiore possibilità di esplicare i suoi comportamenti etologici. Nell'allevamento in cui è avvenuto lo studio i divisori vengono aperti al terzo giorno dopo il parto, in modo da lasciare il tempo alla covata di instaurare la gerarchia (de Passillé et al. 1988) riducendo il rischio degli schiacciamenti.

Lo studio è stato effettuato sempre all'interno delle stesse sale parto, in modo da ridurre al minimo l'interferenza del fattore ambientale, quindi, nell'arco dei 6 mesi, si sono susseguiti 5 cicli (bande) di scrofe nelle stesse sale parto, poiché è stato necessario attendere la fine della lattazione e lo svezzamento delle scrofe, a circa 24 giorni, per l'introduzione dei nuovi soggetti da studiare. In particolare, sono state coinvolte, per ogni ciclo, 10 gabbie convenzionali, 10 gabbie con meccanismo "up and down", 8 gabbie con scivolo, 9 gabbie aperte P e 9 gabbie aperte A.

Durante lo studio, inoltre, ogni scrofa disponeva di una scheda personale in cui venivano annotati tutti gli eventi relativi al parto (ordine di parto, numero di nati vivi, nati morti e mummificati) e alla lattazione, con particolare riguardo al numero di suinetti schiacciati. Nella tabella 1 sono riportati i principali dati relativi allo studio, suddivisi a seconda della tipologia di gabbia parto utilizzata.

| Parametro                 | Convenzionale | Up and Down | Con scivolo | Aperta P | Aperta A |
|---------------------------|---------------|-------------|-------------|----------|----------|
| <b>Numero di scrofe</b>   | 50            | 48          | 38          | 36       | 41       |
| <b>Ordine di parto</b>    | 4° parto      | 4° parto    | 5° parto    | 4° parto | 4° parto |
| <b>Nati vivi totali</b>   | 791           | 755         | 533         | 562      | 687      |
| <b>Nati vivi/scrofa</b>   | 15,9          | 15,5        | 14          | 16,3     | 16,2     |
| <b>Nati morti/scrofa</b>  | 0,9           | 1,15        | 1,3         | 0,7      | 0,9      |
| <b>Mummificati/scrofa</b> | 0,4           | 0,4         | 0,2         | 0,4      | 0,2      |

**Tabella 1.** Valore medio dei parametri principali considerabili in una scrofa, relativi all'intero gruppo di studio e suddivisi per tipologia di gabbia parto.

**Table 1.** Mean value of the main parameters considered in a sow, relative to the whole study group, based on type of farrowing cage.



Sono stati effettuati due prelievi di sangue per scrofa, il primo a tre giorni dal parto e il secondo due giorni prima dello svezzamento. La scelta delle scrofe da prelevare si è basata sulla data del parto e il prelievo è stato sempre eseguito tra le 10.00 e le 10.30 del mattino, poiché il picco di produzione del cortisolo nel suino è al mattino, essendo questo un animale diurno (Skarlandtová et al., 2012). Il giorno in cui i veterinari andavano in allevamento per eseguire i prelievi, selezionavano solo le scrofe che avevano partorito tre giorni prima. Non essendo i parti sincronizzati, nello studio è rientrato un numero diverso di scrofe per gabbia per ciclo, per un totale di 16 scrofe alloggiate nelle gabbie convenzionali, 15 scrofe nelle gabbie con meccanismo “up and down”, 11 scrofe nelle gabbie con scivolo, 16 scrofe nelle gabbie aperte P e 18 scrofe nelle gabbie aperte A. Il prelievo di sangue è stato effettuato dalla vena mammaria, in modo da disturbare il meno possibile gli animali (Scollo et al., 2019), con provette Vacutainer® provviste di EDTA, che sono state trasportate tempestivamente e ad temperatura di 5°C all’Università di Medicina Veterinaria di Parma, Dipartimento di Clinica Ostetrica, dove sono state centrifugate, sierate e conservate idoneamente fino al loro trasporto presso il Dipartimento di Scienze Agro Alimentari, Ambientali, Animali dell’Università di Udine.

#### *Specifiche della ricerca per il cortisolo ed il DHEA*

Le analisi specifiche per la ricerca del cortisolo e del DHEA sono state eseguite presso il Dipartimento di Scienze Agro Alimentari, Ambientali, Animali dell’Università di Udine. Le concentrazioni plasmatiche di cortisolo e DHEA sono state misurate usando un RIA per microtitoli in fase solida dopo l’estrazione di dietil etere. In breve, una piastra per microtitolazione a 96 pozzetti (Optiplate, Perkin-Elmer Life Science, Boston, MA, USA) è stata rivestita con siero anti-coniglio  $\gamma$ -globulina sospeso in una capra diluita 1: 1000 in tampone acetato di sodio 0,15 mM, pH 9 e incubazione durante la notte a 4°C. La piastra è stata quindi lavata due volte con tampone RIA (pH 7,4) e incubata per una notte a 4 ° C con 200  $\mu$ L di siero anticorpale diluito a rapporti di 1: 20.000 per cortisolo (Analytical Antibodies, Bologna, Italia), 1:2000 per DHEA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Le reattività crociate dell’anticorpo anti-cortisolo con altri steroidi erano le seguenti: cortisolo, 100%; corticosterone, 1,8%; aldosterone, <0,02%. Le reattività crociate dell’anticorpo anti-DHEA con altri steroidi erano le seguenti: DHEA, 100%; pregnenolone, 0,1%; androstenediol, 0,08%; diidrotosterone, 0,05%; solfato DHEA, 0,02%; testosterone, 5 $\alpha$ -androstane-diol-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ -androstane-diol-3 $\alpha$ , androsterone, epiandrosterone e 5 $\beta$ -androstane-3, 9,2%; epiandrosterone, 2,8%; pregnenolone, 1,8%; 5 $\alpha$ -androstane-diolo-3 $\alpha$ , estradiolo, progesterone, colesterolo ed estrone, <0,001%. Dopo aver lavato la piastra con tampone RIA, gli standard (5–200 pg / pozzetto), l’estratto di controllo qualità, gli estratti di prova e il tracciante (idrocortisone {cortisolo [1,2,6,7-3H (N)]-}, sono stati aggiunti DHEA [1,2,6,7-3H (N)] e la piastra è stata incubata durante la notte a 4 ° C. Gli ormoni legati sono stati separati dagli ormoni liberi decantando e lavando i pozzetti in tampone RIA. Dopo l’aggiunta di 200  $\mu$ L di cocktail di scintillazione, la piastra è stata contata su un contatore  $\beta$  (Top-Count, PerkinElmer Life Sciences Inc., Waltham, MA, USA). I coefficienti di variazione intra e inter-coefficiente per il cortisolo erano 3,7% e 11,0% rispettivamente. I coefficienti di variazione intra e inter-coefficiente per DHEA erano rispettivamente del 3,8% e del 10,7%. La sensibilità del dosaggio (definita come concentrazione ormonale con conseguente spostamento dell’ormone marcato di almeno 2 deviazioni standard dal massimo legame) era 1,23 pg per pozzetto e 0,62 rispettivamente per cortisolo e DHEA.

#### *Analisi statistica*

L’analisi statistica relativa al cortisolo, al DHEA e al rapporto cortisolo/DHEA è stata effettuata utilizzando le misure ripetute del modello lineare generalizzato, ponendo la

gabbia e la banda (stagionalità) come fattore fisso e il prelievo di sangue (primo e secondo prelievo) come misura ripetuta. Le variabili dipendenti sono state il cortisolo, il DHEA e il rapporto cortisolo/DHEA. L'analisi statistica relativa ai dati dello schiacciamento è avvenuta attraverso il software SPSS–IBM, secondo un modello statistico che prevede come fattori fissi la tipologia di gabbia e la banda (stagionalità), covariando i dati relativi al parto e alla lattazione per i nati vivi storici di ciascuna scrofa, allo scopo di ridurre, almeno in parte, il fattore genetico relativo alla prolificità. La significatività (P) è stata posta a 0,05.

## RISULTATI

Le analisi effettuate sui campioni di sangue, inerenti ai valori di cortisolo, DHEA e cortisolo/DHEA, non hanno evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa fra i due prelievi nelle diverse tipologie di gabbie parto, come è possibile osservare nella tabella 1.

| Parametro                | Convenzionale |       | Up and Down |       | Con scivolo |       | Aperta P |       | Aperta A |       | Significatività |          |
|--------------------------|---------------|-------|-------------|-------|-------------|-------|----------|-------|----------|-------|-----------------|----------|
|                          | 1°            | 2°    | 1°          | 2°    | 1°          | 2°    | 1°       | 2°    | 1°       | 2°    | Gabbia          | Prelievo |
| <b>Cortisolo (ng/ml)</b> | 16,04         | 15,69 | 15,12       | 20,08 | 20,02       | 16,82 | 10,35    | 12,96 | 13,67    | 13,88 | 0,039           | 0,529    |
| <b>DHEA (ng/ml)</b>      | 0,06          | 0,06  | 0,13        | 0,05  | 0,06        | 0,05  | 0,03     | 0,04  | 0,03     | 0,050 | 0,684           | 0,671    |
| <b>Cort/DHEA</b>         | 423,1         | 304,9 | 387,5       | 430,1 | 555,3       | 485,3 | 209,6    | 354,9 | 439,4    | 322,8 | 0,152           | 0,625    |

**Tabella 1.** Valori di cortisolo, DHEA e cortisolo/DHEA nel primo (1°) e secondo (2°) prelievo di sangue nelle diverse tipologie di gabbie parto. A seguire la significatività in relazione alla gabbia e al prelievo per i tre parametri analizzati ( $P < 0,05$ ).

**Table 1.** Values of cortisol, DHEA and cortisol / DHEA in the first (1°) and second (2°) blood sampling in the different types of farrowing cages. Following the significance in relation to the cage and the sampling for the three parameters analysed ( $P < 0.05$ ).

Anche i valori medi di due parametri su tre (DHEA e cortisolo/DHEA) non hanno riportato differenze significative in base alla tipologia di gabbia parto, mentre il valore medio della cortisolemia ha evidenziato una differenza significativa ( $P = 0,039$ ) a favore della gabbia aperta P, ovvero la gabbia aperta con la pavimentazione in plastica. Quest'ultima, in particolare, ha dimostrato di differire in maniera fortemente significativa dalla gabbia con meccanismo "up and down" e dalla gabbia con scivolo, le quali hanno riportato i valori di cortisolemia peggiori (tabella 2).

|                             | Convenzionale        | Up and Down         | Con scivolo         | Aperta P            | Aperta A             |
|-----------------------------|----------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Cortisolemia (ng/ml)</b> | 15,865 <sup>ab</sup> | 17,599 <sup>b</sup> | 18,422 <sup>b</sup> | 11,659 <sup>a</sup> | 13,777 <sup>ab</sup> |

**Tabella 2.** Cortisolemia media nelle diverse tipologie di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ .

**Table 1.** Medium cortisolemia in the different types of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0.05$

Per quanto riguarda la stagionalità (banda) è stata invece riscontrata una forte differenza significativa ( $P < 0,001$ ) sia per quanto riguarda il cortisolo che il cortisolo/DHEA, ma l'analisi di questi dati merita un ulteriore approfondimento, che verrà effettuato in un momento futuro. Nella tabella 3 sono invece riportati i dati relativi alla mortalità totale, avuta nell'intero periodo di lattazione, in relazione alla tipologia di gabbia parto, riportando anche la suddivisione in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa (sottopeso, scarto, diarrea, streptococco, castrazioni o ernie con esito negativo).

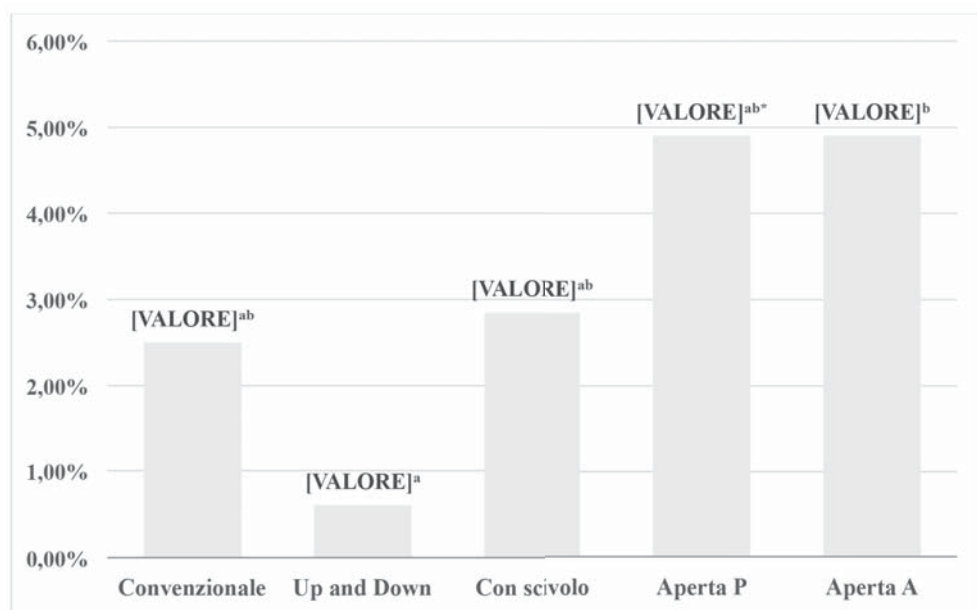


| Parametro                      | Convenzionale            | Up and Down             | Con scivolo               | Aperta P                  | Aperta A                 |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| <b>Morti totali/scrofa (%)</b> | 1,1 (6,9%) <sup>ab</sup> | 0,7 (4,5%) <sup>a</sup> | 0,8 (5,7%) <sup>a</sup>   | 1,9 (11,6%) <sup>b</sup>  | 1,2 (7,4%) <sup>ab</sup> |
| <b>- Schiacciati (%)</b>       | 0,4 (2,5%) <sup>ab</sup> | 0,1 (0,6%) <sup>a</sup> | 0,4 (2,85%) <sup>ab</sup> | 0,8 (4,9%) <sup>ab*</sup> | 0,8 (4,9%) <sup>b</sup>  |
| <b>- Altra causa (%)</b>       | 0,7 (4,4%)               | 0,6 (3,9%)              | 0,4 (2,85%)               | 1,1 (6,7%)                | 0,4 (2,5%)               |

**Tabella 3.** Valore medio e percentuale dei dati relativi alla mortalità totale, alla mortalità per schiacciamento e alla mortalità per altra causa, in relazione alla tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: elevato Standard Error ( $ES=0,22$ ), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Table 3.** Mean and percentage value of data on total mortality, crushing mortality and mortality due to other causes, depending on the type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0.05$ . \*: high Standard Error ( $ES=0,22$ ), indicative of high population variability within the open cage P.

Dalla tabella 3 si può evincere che la gabbia con meccanismo “up and down” e la gabbia con scivolo hanno registrato una minore percentuale di mortalità totale in lattazione, differendo in maniera significativa dalla gabbia aperta P (rispettivamente,  $P=0,008$  e  $P=0,035$ ), che invece ha riportato la percentuale più elevata. Analizzando nello specifico le cause di mortalità, è possibile notare che i suinetti morti per altra causa non hanno rilevato importanti differenze significative, a dispetto invece dei suinetti morti per schiacciamento ( $P=0.003$ ), come illustrato nel grafico 1.



**Grafico 1.** Percentuali relative alla mortalità per schiacciamento in relazione alla diversa tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: elevato Standard Error ( $ES=0,22$ ), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Graphic 1.** Percentages related to crushing mortality in relation to the different type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0.05$ . \*: high Standard Error ( $ES=0,22$ ), indicative of high population variability within the open cage P.

Il grafico 1 mostra con chiarezza come la gabbia con meccanismo “up and down” si è rilevata essere la migliore nel ridurre il tasso di mortalità causato dallo schiacciamento, differendo in maniera statisticamente significativa dalla gabbia aperta A ( $P=0.003$ ). Nonostante la gabbia aperta P presenti la stessa percentuale di schiacciamento della gabbia aperta A, dalle analisi effettuate questa non si è rilevata essere statisticamente significativa a causa della presenza di un elevato Standard Error, che denota un’elevata variabilità della popolazione al suo interno, riportando invece solo una tendenza verso la gabbia con meccanismo “up and down” ( $P=0,053$ ).

## DISCUSSIONE

Oggi, il benessere animale è un argomento di crescente interesse nella nostra società, soprattutto se si parla di allevamenti intensivi suinicoli, ed è per questo motivo che da un po’ di anni si sta cercando di individuare nuovi parametri in grado di valutare il benessere animale in maniera sempre più meticolosa. Il DHEA, per esempio, rientra tra questi, ed esso, insieme al cortisolo, viene considerato come un indicatore di allostasi (McEwen, 2003; Charney, 2004) e di resilienza (Russo et al., 2012; Peric et al., 2017), mentre il loro rapporto viene considerato un indice di equilibrio anabolico/catabolico (Qiao et al., 2017). Come già precedentemente illustrato, la resilienza rappresenta la capacità di un sistema di adattarsi al cambiamento (Wieland e Wallenburg, 2013), mentre l’allostasi la capacità di mantenere la stabilità dei sistemi fisiologici per mezzo del cambiamento<sup>2</sup>. Sia il cortisolo che il DHEA sono degli ormoni steroidei prodotti a livello di corteccia surrenale ed entrambi giocano un ruolo importante nel controllo e nella regolazione del metabolismo, nello specifico glucidico il primo (Skarlandtová et al., 2012) e lipidico il secondo (Hansen et al., 1997). È stato dimostrato (Parker et al., 1985) che i suini sottoposti a stress mostrano un aumento del livello di cortisolo, per stimolare il metabolismo e la produzione di energia, e una diminuzione del DHEA. Il rapporto cortisolo/DHEA potrebbe quindi essere un fattore importante nel determinare il funzionamento dell’asse ipotalamo-ipofisi-surrene (Saczawa et al., 2013), che si attiva in presenza di fattori stressogeni. Trevisan et al. (2017) hanno osservato in suini stressati un aumento del rapporto cortisolo/DHEA e hanno ipotizzato che, per reagire positivamente ai cambiamenti di tipo ambientale (es: trasferimento in un altro luogo, cambio di alimentazione, raggruppamento) sia necessario attuare un elevato sforzo metabolico. Diversi studi (Lawrence et al., 1997; Damm e Pedersen, 2000), inoltre, hanno evidenziato un aumento del cortisolo plasmatico nelle scrofe in lattazione, causato da una soppressione del loro naturale comportamento peri-parto, come la costruzione del nido, e direttamente correlato alla restrizione spaziale e di mobilità della scrofa stessa.

Lo scopo di questo studio è stato quindi di valutare come diverse tipologie di gabbie parto possano influenzare lo stato allostatico e di resilienza delle scrofe in lattazione, con l’obiettivo ultimo di garantire loro un maggior benessere animale. Le analisi effettuate sul sangue non hanno riportato alcuna differenza statisticamente significativa tra il primo e il secondo prelievo nelle diverse tipologie di gabbie parto per nessuno dei tre parametri presi in considerazione (cortisolo, DHEA, cortisolo/DHEA), il che fa ipotizzare che tra l’inizio e la fine della lattazione le scrofe non abbiano subito modifiche al loro stato allostatico e di resilienza, indipendentemente dal tipo di gabbia parto in cui erano alloggiate. Tuttavia, diversi studi (Cronin et al., 1991; Jarvis et al., 2006; Guoan et al., 2016) hanno evidenziato un aumento dei livelli plasmatici di cortisolo nelle scrofe in lattazione a partire dal 28°-29° giorno di lattazione, identificando la gabbia parto come un fattore di stress cronico, con conseguente impatto negativo sul benessere delle scrofe stesse. All’interno del presente studio non è stato riscontrato un aumento di cortisolo plasmatico probabilmente perché le

2 <https://it.wikipedia.org/wiki/Allostasi>

scrofe sono state svezzate dopo circa 24 giorni di lattazione, e non 28 o 29 come negli studi precedenti, quindi è possibile teorizzare che le scrofe abbiano mantenuto invariato il loro stato allostatico e di resilienza durante il loro periodo di permanenza all'interno di ciascuna gabbia parto.

Per quanto riguarda invece i valori medi dei tre parametri nelle diverse tipologie di gabbia parto, la gabbia aperta con la pavimentazione in plastica (aperta P) ha riportato i valori di cortisolemia migliori, differendo in maniera statisticamente significativa con i valori di cortisolemia della gabbia con meccanismo "up and down" e della gabbia con scivolo. Il minor carico allostatico della gabbia parto aperta in plastica permette quindi di ipotizzare che questa gabbia abbia permesso alla scrofa una maggiore possibilità di esprimere i suoi comportamenti etologici. Questo risultato deriva da una analisi in matrice puntuale, quale è il sangue, e dovrà comunque essere confermato da un piano sperimentale che ne permetta una analisi nel lungo periodo in modo da poter meglio valutare l'effetto dei molteplici stressors inerenti questo periodo. Anche le scrofe alloggiate nella gabbia aperta con pavimentazione in acciaio hanno rivelato bassi livelli di cortisolo plasmatico, rappresentando il secondo valore più basso dopo la gabbia aperta P, pur non differendo in maniera statisticamente significativa dalle altre gabbie parto. Ciò rappresenta comunque una conferma che le gabbie parto chiuse per l'intero periodo di lattazione ostacolano l'espressione di comportamenti fortemente motivati, come l'esplorazione dell'ambiente circostante e l'interazione con la propria prole, conducendo ad un minor benessere della scrofa stessa. La mancanza di differenze nelle concentrazioni di DHEA e del rapporto cortisolo/DHEA nelle diverse tipologie di gabbie parto induce invece a presupporre che negli animali non vi sia stata una perdita significativa in resilienza.

È interessante notare come i risultati ottenuti in merito alla mortalità pre-svezzamento sono esattamente contrapposti a quelli ottenuti dall'analisi della cortisolemia, essendo la gabbia con meccanismo "up and down" e la gabbia con scivolo le due tipologie di gabbie parto che hanno registrato una minore mortalità totale in lattazione, in particolare se paragonate alla gabbia aperta con pavimentazione in plastica. Negli ultimi anni sono state infatti ideate delle gabbie parto innovative volte a ridurre il numero dei suinetti morti per schiacciamento (Mazzoni et al., 2018), essendo questa una tra le maggiori cause di mortalità pre-svezzamento (Jarvis et al., 2005). Inoltre, uno studio effettuato da Weber et al. (2007) evidenzia una maggiore percentuale di schiacciamento nelle scrofe alloggiate all'interno di ambienti aperti piuttosto che all'interno di gabbie parto chiuse. Il nostro studio conferma quanto evidenziato da Weber et al. (2007), avendo registrato una maggiore percentuale di schiacciamento nelle gabbie aperte rispetto alle altre tre tipologie di gabbie parto. In particolare, la gabbia parto con meccanismo "up and down" si è dimostrata essere la migliore nel proteggere i suinetti dai movimenti della madre, poiché con il suo meccanismo di innalzamento e abbassamento dell'area della scrofa contestualmente al suo cambio di posizione, i suinetti evitano con più facilità di rimanere schiacciati accidentalmente.

Sebbene nell'allevamento oggetto dello studio le gabbie aperte siano state chiuse nei primi 3 giorni dopo il parto e aperte a partire dal 4° giorno di lattazione, la mortalità per schiacciamento non è stata equivalente alle altre tipologie di gabbia parto, come invece dimostrato dallo studio effettuato da Moustsen et al. (2012). Studi precedenti (Condous et al., 2016) avevano già dimostrato che l'utilizzo di gabbie parto che consentono alla scrofa la libertà di esprimere il proprio comportamento etologico migliora il benessere dell'animale, riducendone lo stress, ma aumenta il numero di suinetti schiacciati rispetto alle gabbie parto che ne limitano i movimenti. Tuttavia, secondo Gu et al. (2011) le perdite in lattazione dovute allo schiacciamento sono indifferenti tra le gabbie parto aperte e quelle chiuse, a patto che le prime siano dotate di apposite barre anti-schiacciamento.

## CONCLUSIONI

Dal presente studio è risultato che le diverse tipologie di gabbie parto hanno ciascuna un'utilità diversa in base ai parametri considerati. In particolare, le gabbie aperte, soprattutto quella con pavimentazione in plastica, hanno rilevato una minore concentrazione plasmatica di cortisolo, quindi un minor carico allostatico nelle scrofe, che probabilmente hanno vissuto con meno stress il periodo di lattazione rispetto alle altre postazioni. La gabbia parto con meccanismo "up and down", invece, si è dimostrata importante nella riduzione della mortalità per schiacciamento pre-svezzamento, soprattutto se paragonata con le gabbie di tipo aperto. La gabbia ideale, che possa quindi tenere conto sia dei bisogni della scrofa in merito al benessere animale sia alla produttività dell'allevatore in merito a un maggior numero di suinetti svezzati, risiede in una via di mezzo tra le gabbie utilizzate nel presente studio. In particolare, la presenza di una gabbia parto con meccanismo "up and down" e in più la possibilità di aprire le sbarre laterali dal 4° giorno post-partum, per farla diventare una gabbia aperta, potrebbe risolvere sia il problema legato alla mortalità in lattazione per schiacciamento che la questione correlata al benessere animale.

## RINGRAZIAMENTI

Corre graditissimo l'obbligo di ringraziare il dott Daniele Pedercini (Evotek srl di Manerbio-BS-) per aver reso possibile lo svolgimento di questa ricerca oltre che un sentito ringraziamento alla Famiglia Cremaschini tutta, per aver messo a disposizione, con grande generosità, la sua azienda affinché lo studio avesse luogo.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Barnett J. L., Hemsworth P. H., Cronin G. M., Jongman E. C., Hutson G. D. (2001) "A review of the welfare issues for sows and piglets in relation to housing". *Australian Journal of Agricultural Research* 52: 1-28.
3. Bergamin C., Comin A., Corazzin M., Faustini M., Peric T., Scollo A., Gottardo F., Montillo M., Prandi A. (2019) "Cortisol, DHEA, and Sexual Steroid Concentrations in Fattening Pigs' Hair". *Animals* 9: 345.
4. Charney D. S. (2004) "Psychobiological mechanisms of resilience and vulnerability: implications for successful adaptation to extreme stress". *Am J Psychiatry* 161(2): 195-216.
5. Cronin G. M., Barnett J. L., Hodge F. M., et al. (1991) "The welfare of pigs in two farrowing/lactation environments: cortisol responses of sows". *Applied Animal Behaviour Science* 32(2): 117-127.
6. Damm B. I., Pedersen L. J. (2000) "Eliminative behaviour in preparturient gilts previously kept in pens or stalls". *Acta Agric Scand, Sect A*. 50: 316-320.
7. Danholt L., Moustsen V. A., Nielsen M. B. F., Kristensen A. R. (2011) "Rolling behaviour of sows in relation to piglet crushing on sloped versus level floor pens". *Livest Sci*. 141: 59-68.
8. de Passellé A.M.B., Rushen J., Hartsock T.G. (1988) "Ontogeny of teat fidelity in pigs and its relation to competition at suckling", *Can. J. Anim. Sci.*, 68:325-338
9. Greenberg N., Carr J. A., Summers C. H. (2002) "Ethological cause and consequences of the stress response". *Integr Comp Biol* 42: 508-516.
10. Gu Z., Gao Y., Lin B., et al. (2011) "Impacts of a freedom farrowing pen design on sow behaviours and performance". *Preventive veterinary medicine* 102(4): 296-303.

11. Guoan Y., Honggui L., Xiang L., Dongsheng Q., Jun B. (2016) "Effect of Farrowing Environment on Behaviour and Physiology of Primiparous Sows with 35-day Lactation". *Intern J Appl Res Vet Med* 14 (2).
12. Hansen P. A., Han D. H., Nolte L. A., Chen M., Holloszy J. O. (1997) "DHEA protects against visceral obesity and muscle insulin resistance in rats fed a high-fat diet". *Am. J. Physiol.* 273: 1704-1708.
13. Jarvis S., D'Eath R. B., Fujita K. (2005) "Consistency of piglet crushing by sows". *Anim Welfare* 14: 43-51.
14. Jarvis S., D'Eath R. B., Robson S. K., et al. (2006) "The effect of confinement during lactation on the hypothalamic pituitary-adrenal axis and behaviour of primiparous sows". *Physiology & behavior* 87(2): 345-352.
15. Lawrence A. B., McLean K. A., Jarvis S., et al. (1997) "Review. Stress and parturition in the pig". *Reproduction in domestic animals* 32: 231-236.
16. Logan J. G., Barksdale D. J. (2008) "Allostasis and allostatic load: Expanding the discourse on stress and cardiovascular disease". *J. Clin. Nurs.* 17: 201-208.
17. Mazzoni C., Scollo A., Righi F., Bigliardi B., Di Ianni F., Bertocchi M., Parmigiani E., Bresciani C. (2018) "Effects of three different designed farrowing crates on neonatal piglets crushing: preliminary study". *Italian Journal of Animal Science* 17 (2): 505-510.
18. McEwen B. S. (2003) "Interacting mediators of allostasis and allostatic load: Towards an understanding of resilience in aging". *Metabolism* 52: 10-16.
19. Möstl E., Palme R. (2002) "Hormones as indicators of stress". *Domest Anim Endocrinol* 23: 67-74.
20. Moustsen V. A., Hales J., Lahrmann H. P., Weber P. M., Hansen C. F. (2013) "Confinement of lactating sows in crates for 4 days after farrowing reduces piglet mortality". *Animal* 7 (4): 648-654.
21. Ostovic M., Pavicic Z., Tofant A., Kabalin A. E., Mencik S., Potocnjak D., Antunovic B. (2012) "Sow parity, body length, postural changes and piglet crushing". *Veterinarski Archiv.* 82: 319-326.
22. Parker L. N., Levin E. R., Lifrak E. T. (1985) "Evidence for Adrenocortical Adaptation to Severe Illness". *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 947-952.
23. Peric T., Corazzin M., Romanzin A., Bovolenta S., Prandi A., Montillo M., Comin A. (2017) "Cortisol and DHEA concentrations in the hair of dairy cows managed indoor or on pasture". *Livest. Sci.* 202: 39-43.
24. Qiao S., Li X., Zilioli S., Chen Z., Deng H., Pan J., Guo W. (2017) "Hair measurements of cortisol, DHEA, and DHEA to cortisol ratio as biomarkers of chronic stress among people living with HIV in China: Known-group validation". *PLoS ONE* 12: e0169827.
25. Rantzer D., Svendsen J. (2001) "Slatted versus solid floors in the dung area of farrowing pens: effects on hygiene and pig performance, birth to weaning". *Acta Agriculturae Scandinavica: Section A, Animal Science* 51: 167-174.
26. Ringgenberg N., Bergeron R., Meunier-Salaün M. C., et al. (2012) "Impact of social stress during gestation and environmental enrichment during lactation on the maternal behavior of sows". *Applied Animal Behaviour Science* 136(2): 126-135.
27. Roelofs S., Goddinga L., de Haana J. R., van der Staaya F. J., Nordquist R. E. (2019). "Effects of parity and litter size on cortisol measures in commercially housed sows and their offspring". *Physiology & Behavior* 201: 83-90.
28. Russo S. J., Murrough J. W., Han M. H., Charney D. S., Nestler E. J. (2012) "Neurobiology of resilience". *Nat Neurosci* 15(11): 1475-1484.
29. Saczawa M. E., Graber J. A., Brooks-Gunn J., Warren M. P. (2013) "Methodological considerations in use of the cortisol/DHEA(S) ratio in adolescent populations". *Psychoneuroendocrinology* 38: 2815-2819.

30. Scollo A., Bresciani C., Romano G., Tagliaferri L., Righi F., Parmigiani E., Mazzoni C. (2019) "A novel blood sampling technique in lactating sows: The mammary vein route". *The Veterinary Journal* 254: 105397.
31. Selye H. (1963) "A syndrome produced by diverse nocuous agents". *Nature* 138: 32.
32. Skarlandtová H., Bičíková M., Neužil P., Mlček M., Hrachovina V., Svoboda T., Medová E., Kudlička J., Dohnalová A., Havránek S., Kazihnítková H., Máčová L., Vařejková E., Kittnar O. (2012) "Might Cardiac Catheterization Influence Diurnal Rhythm of the Steroid Stress Hormones Secretion?" *Physiol. Res.* 61: 25-34.
33. Snyder C. R. (1999) "Coping: the psychology of what works", Oxford University Press.
34. Trevisan C., Montillo M., Prandi A., Mkupasi E. M., Ngowi H. A., Johansen M. V. (2017) "Hair cortisol and dehydroepiandrosterone concentrations in naturally *Taenia solium* infected pigs in Tanzania". *Gen. Comp. Endocrinol* 246: 23–28.
35. Tummaruk P., Nuntapaitoon M., Muns R. (2017) "Management strategies to reduce piglet pre-weaning mortality". *Thai J Vet Med Suppl.* 47: S17-S20.
36. Weber R., Keil N. M., Fehr M., Horat R. (2007) "Piglet mortality on farms using farrowing systems with or without crates". *Animal Welfare* 16: 277–279.
37. Weber R., Keil N. M., Fehr M., Horat R. (2009) "Factors affecting piglet mortality in loose farrowing systems on commercial farms". *Livestock Science* 124: 216–222.
38. Wieland A., Wallenburg C.M. (2013) "The Influence of Relational Competencies on Supply Chain Resilience: A Relational View". *International Journal of Physical Distribution & Logistics Management* 43 (4): 300-320.





# CONFRONTO TRA GLI INDICATORI ICEBERG DI BENESSERE ANIMALE RILEVATI AL MACELLO E LE CONDIZIONI AMBIENTALI NEGLI ALLEVAMENTI DI SUINI A CODA INTEGRA: STUDIO PRELIMINARE

## COMPARISON OF ICEBERG ANIMAL WELFARE INDICATORS DETECTED AT THE SLAUGHTERHOUSE WITH ENVIRONMENTAL CONDITIONS IN UNDOCKED PIG FARMS: A PRELIMINARY STUDY

GUADAGNO F.<sup>1</sup>, GIUDICI F.<sup>1</sup>, MAISANO A.M.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, SCALI F.<sup>1</sup>,  
FORMENTI N.<sup>1,2</sup>, TONNI M.<sup>1</sup>, ROMEO C.<sup>2</sup>, DE LUCA, S.<sup>2</sup>, GHIDINI S.<sup>2</sup>,  
IANIERI A.<sup>2</sup>, CASTELLUCCIO D.<sup>3</sup>, SANTUCCI U.<sup>3</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna;*

<sup>2</sup>*Dipartimento di Scienze degli Alimenti e del Farmaco - Università di Parma;*

<sup>3</sup>*Ministero della Salute*

**Parole Chiave:** Suino Pesante, Benessere Animale, Macello

**Key Words:** Heavy Pig Production, Animal Welfare, Slaughterhouse

### RIASSUNTO

La valutazione al macello degli indicatori “iceberg” (lesioni alla coda ed alla cute) è uno strumento efficiente per il monitoraggio del benessere animale. Nel nostro studio precedente sono emerse differenze significative della prevalenza di questi indicatori tra allevamenti. Lo scopo del presente studio è stato quello di investigare come le condizioni in allevamento potrebbero aver influenzato tali differenze. Al macello sono state campionate 20 partite di 11 allevamenti di suino pesante italiano a coda integra. Gli 11 allevamenti sono stati valutati col questionario ClassyFarm per il rischio della morsicatura della coda. L'effetto delle condizioni in allevamento sulle lesioni alla coda e alla cute è stato investigato con un test t di Student o un test U di Mann-Whitney. In totale sono state registrate il 36,0% di carcasse con lesioni alla coda (9,8% gravi) e il 34,0% con lesioni alla cute (11,3% gravi). Il microclima è risultato ottimale in sei allevamenti; la densità e i gas nocivi in cinque. Le lesioni alla coda sono state significativamente più basse ( $P = 0,022$ ) negli allevamenti con microclima ottimale e quelle gravi significativamente minori ( $P = 0,021$ ) con gas nocivi ottimali. Il campione ridotto ha reso possibile investigare solo un numero limitato di fattori. L'assenza di effetti sulle lesioni cutanee può essere stata condizionata anche lesioni incorse durante il carico/trasporto. L'effetto del microclima e dei gas sulle lesioni alla coda conferma l'importanza di ricambio d'aria adeguato.

### ABSTRACT

Assessing of “iceberg” indicators (tail and skin lesions) at the slaughterhouse is an efficient tool for monitoring animal welfare. In our previous study, significant differences in the prevalence of these indicators were found among farms. The aim of the present study was to investigate how on-farm conditions might have influenced such differences. At the slaughterhouse, 20 batches of 11 pig farms were sampled. The 11 farms were assessed for tail-biting risk using the ClassyFarm questionnaire. All the farms reared heavy pigs (>160 kg) with undocked tails. The effect of farm conditions on tail and skin lesions was investigated with either Student's t-test or Mann-Whitney U-test. A total of 35,0% carcasses

had tail lesions (9,8% severe) and 34,0% with skin lesions (11,3% severe) were found. The microclimate was optimal in six farms; density and noxious gases in five. Tail lesions were significantly lower ( $P = 0.022$ ) on farms with an optimal microclimate and severe tail lesions were significantly lower ( $P = 0.021$ ) in farms with optimal noxious gases. Only a limited number of factors could be investigated because of the small sample size which should be increased in future investigations. The lack of effect of on-farm conditions on skin lesions may also have been influenced by injuries incurred during loading/transport. The effect of microclimate and gases on tail lesions confirms the importance of adequate air exchange.

## INTRODUZIONE

Il benessere del suino nell'allevamento industriale rappresenta una tematica etica e scientifica di notevole importanza sia nel dibattito pubblico che tra gli operatori del settore. Pertanto, l'impiego di sistemi di monitoraggio riveste un ruolo di garanzia per tutti i soggetti interessati (produttori, Autorità Competenti, distributori e consumatori); tali sistemi, per essere efficienti, devono contemplare la raccolta d'informazioni sia a livello di allevamento che al macello (EFSA, 2011).

Le rilevazioni in azienda dovrebbero comprendere sia misurazioni, dirette e indirette, sullo stato degli animali (*animal-based measures* – ABMs) sia valutazioni su quelle condizioni, strutturali e gestionali, che possono influenzare il benessere dei suini (EFSA 2014). Sebbene l'utilità delle ABMs sia evidente, poiché rappresentano la capacità di adattamento dell'animale all'ambiente in cui vive (Welfare Quality 2009; OIE 2013), le valutazioni sulle strutture e il management dell'allevamento possono essere altrettanto importanti al fine di analizzare e correggere le suddette interazioni, in particolare quando le ABMs si manifestano con prevalenze importanti. Gli audit in allevamento richiedono molto tempo per la loro esecuzione, mentre le osservazioni al macello, in particolar modo le ABMs, tendono ad essere facilmente rilevabili, meno onerose, ed eseguibili su un numero di allevamenti maggiore per unità di tempo (Van Staaveren et al., 2017a). Di conseguenza, le osservazioni al macello possono fornire una conveniente integrazione ai dati raccolti in azienda fornendo all'Autorità competente ulteriori informazioni sullo stato di benessere negli allevamenti (reg. esecuz. (UE) 2019/627). A tale scopo, le lesioni alla coda e alla cute sono i parametri che vengono inclusi con maggior frequenza nei sistemi di monitoraggio (EFSA 2012) e che possono essere considerati degli indicatori "iceberg" (Van Staaveren et al., 2017a) del benessere in azienda. Tuttavia, la mancanza di uno standard univoco può rendere difficoltoso il confronto tra dati provenienti da Paesi differenti (Maisano et al., 2019).

Un'elevata frequenza di lesioni alla coda, come esito di fenomeni di cannibalismo, è causa di importanti perdite economiche (Van Staaveren et al., 2017b) e rappresenta una conseguenza di problemi gestionali e/o strutturali dell'allevamento (FVO, 2017). Le lesioni cutanee sono generalmente il risultato di fenomeni di aggressività che possono verificarsi sia in allevamento che durante il trasporto o nelle stalle di sosta. I fattori che possono influenzare la loro incidenza in allevamento sono molteplici quali, ad esempio, inadeguate condizioni ambientali, spazi a disposizione ridotti, fattori genetici e climatici (Arduini et al., 2017; Bottacini et al., 2018).

In un nostro studio precedente, effettuato su aziende che allevano suini a coda integra, sono emerse differenze significative tra le prevalenze delle lesioni alla coda e alla cute di carcasse provenienti da allevamenti diversi (Guadagno et al., 2021). Lo scopo del presente lavoro è stato quello d'investigare eventuali fattori gestionali e/o strutturali che potrebbero aver indotto tali differenze.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Lo studio è stato condotto su un campione di 11 aziende del Nord Italia che allevano suino pesante italiano a coda integra, raccogliendo dati in allevamento e al macello. Le ispezioni al macello si sono svolte tra febbraio 2019 e gennaio 2020, hanno interessato tre stabilimenti (anch'essi ubicati in Nord Italia) e, complessivamente, sono state valutate le carcasse di 20 partite di macellazione.

### *Valutazioni al macello*

Le carcasse incluse nello studio sono state ispezionate da due veterinari appositamente formati, focalizzandosi sulla presenza di eventuali lesioni alla coda e alla cute. La raccolta dati è avvenuta tramite tablet utilizzando un applicativo del sistema ministeriale di monitoraggio ClassyFarm ([www.classyfarm.it](http://www.classyfarm.it)). I suini sono stati osservati sulla linea di macellazione ad una distanza di circa un metro, dopo le normali operazioni di macellazione, in corrispondenza del punto di ispezione post-mortem del veterinario ufficiale. Le lesioni alla coda sono state valutate secondo un sistema di *scoring* a cinque punti; partendo dallo 0 che indica l'assenza di lesioni fino a “complete loss” (CL), assegnato in caso perdita completa della coda (equivalente allo *score* 4 di Vom Brocke et al., 2018). Per la valutazione delle lesioni cutanee è stata utilizzata una scala a quattro punti, in ordine crescente, secondo la dimensione e gravità della lesione, da 0 (nessuna lesione o danno lieve e superficiale) fino a 3 (lesioni gravi molto profonde). Per problemi organizzativi, non è stato possibile assegnare lo *score* cute ad una partita delle aziende investigate. Le modalità di valutazione delle lesioni alla coda e alla cute sono state descritte nel dettaglio nel lavoro precedente (Guadagno et al., 2021) di cui il presente costituisce il *follow-up*.

### *Valutazioni in allevamento*

I parametri strutturali e gestionali sono stati selezionati a partire dal questionario ClassyFarm “*valutazione del rischio taglio coda suino da ingrasso e svezamento*”. Tale questionario consta di 21 domande generalmente con tre possibili risposte (insufficiente, accettabile, ottimale) ed è suddiviso in tre aree (ClassyFarm, 2018):

- A: Management aziendale (7 quesiti)
- B: Strutture ed attrezzature (8 quesiti)
- C: *Animal-based measures* – ABMs (6 quesiti)

Al fine di valutare l'influenza della componente gestionale e strutturale dell'allevamento sulla presenza di lesioni caudali e/o cutanee, sono stati considerati i seguenti parametri:

- Densità degli animali
- Condizioni microclimatiche (temperatura, umidità relativa e polverosità)
- Gas nocivi

inclusi nell' area B del questionario ClassyFarm. Per ognuno dei suddetti parametri, le aziende oggetto di studio sono state quindi suddivise in due gruppi in base agli esiti dei rispettivi questionari: ottimale o non ottimale (parametro classificato come insufficiente o accettabile).

I risultati dei questionari ClassyFarm sono stati raccolti con la collaborazione dei Veterinari aziendali e il consenso all'utilizzo anonimo da parte della Proprietà.

### *Densità degli animali*

La direttiva (2008/120/CE) e il successivo decreto attuativo italiano (d.lgs. n. 122/2011)

indicano la superficie libera minima disposizione di ciascun capo allevato in funzione del peso. La valutazione **insufficiente** viene assegnata quando gli spazi a disposizione sono al di sotto dei limiti previsti dalla normativa. La condizione **accettabile** è raggiunta col rispetto della densità stabilita dalla normativa (d.lgs. n. 122/2011). La condizione **ottimale**, invece, si verifica quando lo spazio disponibile per ciascun soggetto risulta superiori ai valori calcolati con la seguente formula:

Dove  $k$  è una costante (0,036) e PV il peso vivo, in kg, degli animali valutati. Ad esempio, in un box con suini di 110 kg la condizione ottimale si raggiunge con spazi disponibili superiori a  $0,84 \text{ m}^2$  per capo ( $0,036 \times 110^{0,67} = 0,84$ ). Nella formula deve essere inserita sempre la categoria di peso maggiore presente nel settore valutato (EFSA, 2005); le tabelle di valutazione per categoria di peso e ulteriori approfondimenti sul calcolo della densità sono disponibili sull'apposito manuale (ClassyFarm, 2018).

#### *Condizioni microclimatiche: temperatura, umidità relativa e polverosità*

Secondo quanto previsto dal decreto legislativo 146/2001 la circolazione dell'aria, la quantità di polvere, la temperatura, l'umidità relativa dell'aria e le concentrazioni di gas devono essere mantenute ad un livello tale per cui non arrechino danno agli animali. Il decreto, tuttavia, non prescrive alcun limite specifico relativamente a tali parametri. Per valutare tali criteri è stato sviluppato un apposito manuale da un gruppo di lavoro che ha visto coinvolti numerosi enti ed associazioni sia pubbliche che private (ClassyFarm, 2018). Per ulteriori approfondimenti sulla valutazione di temperatura, umidità relativa e polverosità ed ai valori di comfort, si rimanda al suddetto manuale (ClassyFarm, 2018).

Le condizioni microclimatiche vengono considerate **insufficienti** qualora non siano adeguate al benessere degli animali (es. ambienti privi di adeguata ventilazione, polverosità troppo elevata). **Accettabili** quando idonee per gli animali (es. ventilazione naturale o impianti di ventilazione privi di sistemi di controllo). Infine, quella **ottimale** quando il microclima risulta ottimale (es. impianti di condizionamento automatizzato del microclima o ventilazione naturale coadiuvata da sistemi di controllo).

#### *Concentrazione di gas nocivi*

La presenza di gas nocivi in allevamento viene valutata considerando le concentrazioni di ammoniaca ( $\text{NH}_3$ ) e di anidride carbonica ( $\text{CO}_2$ ).

Sono considerati **insufficienti** valori di ammoniaca superiori a 20 ppm e/o valori di anidride carbonica oltre le 3.000 ppm. In caso concentrazioni di gas eccessive (es.  $\text{NH}_3$  superiore a 20 ppm) gli animali possono mostrare un'iperemia delle congiuntive accompagnata da lacrimazione; inoltre, tali sintomi possono essere manifestati anche dal valutatore. La condizione **accettabile** si verifica con ammoniaca tra 10 e 20 ppm e anidride carbonica inferiore a 3.000 ppm; quella **ottimale** quando l'ammoniaca è al di sotto delle 10 ppm. Per ulteriori approfondimenti sulla valutazione dei gas nocivi si rimanda all'apposito manuale (ClassyFarm, 2018).

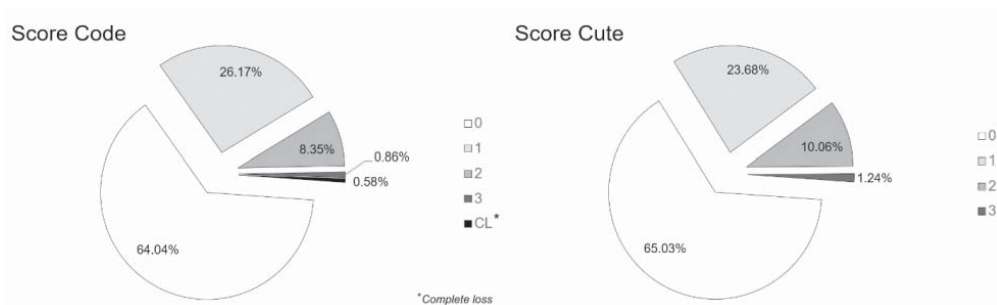
#### *Analisi statistica*

I dati raccolti, una volta esportati dal database ClassyFarm, sono stati organizzati e preparati per le successive analisi statistiche tramite Microsoft Excel (Microsoft Corporation. Redmond, WA, USA). Gli allevamenti sono stati suddivisi in due gruppi, a seconda della presenza o meno di condizioni ottimali, per ciascuno dei tre indicatori considerati (densità, condizioni microclimatiche, gas nocivi). Per ognuno di essi, eventuali

differenze significative tra i due gruppi di aziende nella prevalenza delle lesioni di coda e cute sono state investigate tramite test t di Student per dati non appaiati oppure test U di Mann-Whitney; a seconda della distribuzione, normale o meno, dei dati (verifica effettuata mediante test di Shapiro-Wilk). Sono state analizzate le differenze sia della prevalenza di tutte le lesioni che di quella delle sole lesioni gravi (score  $\geq 2$ ). Il limite di significatività è stato fissato a  $P < 0,05$  per tutti i test. Le analisi statistiche sono state effettuate con GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

## RISULTATI

Le condizioni della coda sono state ispezionate in 2778 suini di 20 partite provenienti da 11 aziende mentre, per quanto riguarda la cute, sono state valutate 2585 carcasse di 19 partite da 10 allevamenti. Il 36,0% delle carcasse esaminate presentava lesioni alla coda ed il 9,8% lesioni gravi; il 35,0% lesioni alla cute, l'11,3% lesioni gravi. La distribuzione degli *score* di tutte le carcasse ispezionate per i due parametri considerati è illustrata in figura 1. A livello di allevamento, le medie e relative deviazioni standard delle valutazioni alla coda sono risultate le seguenti: *score* 0: 64,0%  $\pm$  12,8%; *score* 1: 26,4%  $\pm$  9,0%; *score* 2: 7,8%  $\pm$  5,6%; *score* 3: 0,9%  $\pm$  1,1%; *complete loss*: 0,9%  $\pm$  1,3%. Per la cute: *score* 0: 66,5%  $\pm$  15,3%; *score* 1: 22,3%  $\pm$  8,5%; *score* 2: 9,9%  $\pm$  7,7%; *score* 3: 1,3%  $\pm$  0,9%.



**Figura 1.** Distribuzione degli score di coda (totale = 2778) e cute (totale = 2585) delle carcasse valutate nello studio

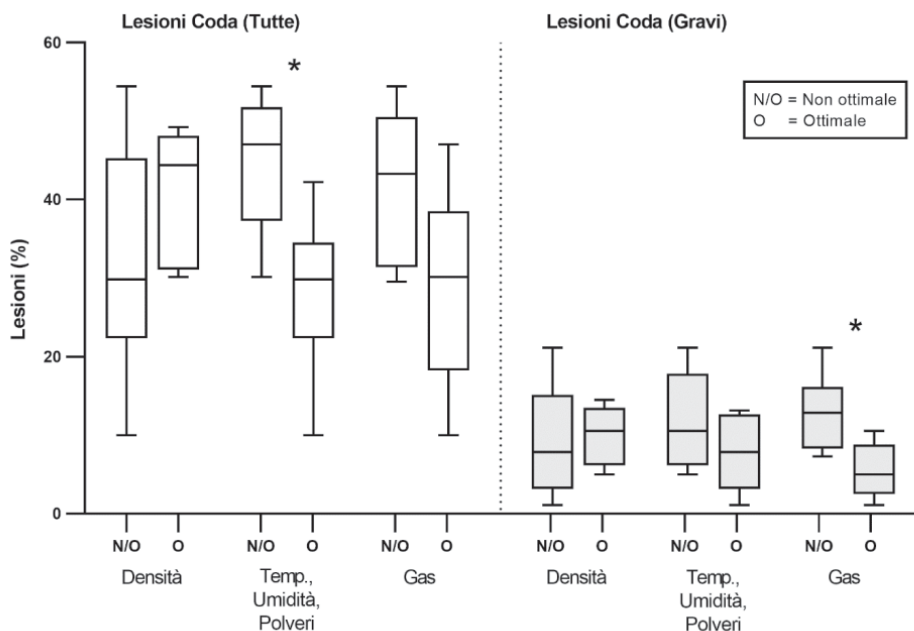
**Figure 1.** Distribution of tail (total = 2778) and skin (total = 2585) scores of carcasses evaluated in the study

In sei degli allevamenti investigati erano presenti condizioni microclimatiche (temperatura, umidità relativa e polveri) ottimali mentre, per densità degli animali e concentrazione di gas nocivi, valori ottimali sono stati rilevati in cinque delle 11 aziende. In tabella 1 sono riportati i punteggi della coda e della cute per ciascun allevamento incluso nello studio e le valutazioni della *check-list* ClassyFarm per quanto riguarda la densità degli animali, le condizioni ambientali (temperatura, umidità relativa e polveri) e la concentrazione di gas potenzialmente nocivi.

**Tabella 1.** Risultati delle valutazioni al macello (score coda e cute) e in allevamento (densità suini, condizioni microclimatiche, gas nocivi) per ciascuna azienda inclusa nello studio  
**Table 1.** Results of slaughterhouse (tail and skin scores) and on-farm evaluations (pig density, environmental conditions, noxious gases) for each farm included in the study

|                                                        |         |      | Score Code |     |    |   |     | Score Cute |     |    |   | Check-list<br>ClassyFarm                             |                        |               |  |
|--------------------------------------------------------|---------|------|------------|-----|----|---|-----|------------|-----|----|---|------------------------------------------------------|------------------------|---------------|--|
| Azienda                                                | Partite | Capi | 0          | 1   | 2  | 3 | CL* | 0          | 1   | 2  | 3 | Densità                                              | T†,<br>UR‡,<br>Polveri | Gas<br>Nocivi |  |
| A                                                      | 1       | 214  | 119        | 64  | 22 | 8 | 1   | 145        | 51  | 14 | 4 | O                                                    | A                      | A             |  |
| B                                                      | 1       | 219  | 153        | 55  | 11 | 0 | 0   | 151        | 53  | 13 | 2 | O                                                    | A                      | O             |  |
| C                                                      | 3       | 388  | 285        | 88  | 8  | 2 | 5   | 226        | 111 | 51 | 0 | A                                                    | O                      | O             |  |
| D                                                      | 1       | 193  | 88         | 64  | 40 | 1 | 0   |            |     |    |   | A                                                    | A                      | A             |  |
| E                                                      | 3       | 390  | 275        | 81  | 32 | 0 | 2   | 260        | 91  | 36 | 3 | A                                                    | O                      | I             |  |
| F                                                      | 1       | 200  | 136        | 39  | 22 | 2 | 1   | 79         | 61  | 55 | 5 | O                                                    | O                      | A             |  |
| G                                                      | 1       | 66   | 35         | 24  | 3  | 1 | 3   | 46         | 15  | 4  | 1 | O                                                    | A                      | O             |  |
| H                                                      | 1       | 90   | 81         | 8   | 0  | 0 | 1   | 53         | 22  | 14 | 1 | A                                                    | O                      | O             |  |
| I                                                      | 3       | 561  | 324        | 163 | 65 | 9 | 0   | 314        | 174 | 64 | 9 | A                                                    | O                      | A             |  |
| L                                                      | 2       | 191  | 97         | 80  | 10 | 1 | 3   | 180        | 11  | 0  | 0 | O                                                    | A                      | A             |  |
| M                                                      | 3       | 266  | 186        | 61  | 19 | 0 | 0   | 227        | 23  | 9  | 7 | A                                                    | O                      | O             |  |
| * Complete loss<br>† Temperatura<br>‡ Umidità relativa |         |      |            |     |    |   |     |            |     |    |   | I = Insufficiente<br>A = Accettabile<br>O = Ottimale |                        |               |  |

Le carcasse provenienti dagli allevamenti con temperatura, umidità relativa e polveri (figura 2) a livelli ottimali hanno mostrato una prevalenza di lesioni alla coda significativamente più bassa ( $P = 0,022$ ) rispetto agli altri; tale differenza non è stata tuttavia rilevata quando si è considerata la sola prevalenza delle lesioni gravi ( $P = 0,266$ ). Al contrario, nel caso dei gas nocivi in concentrazioni ottimali (figura 2), la prevalenza è risultata significativamente più bassa solo per le lesioni gravi ( $P = 0,021$ ) ma non per le lesioni complessive ( $P = 0,087$ ). Per i restanti parametri valutati (figura 2) non sono emerse differenze significative tra gli allevamenti.

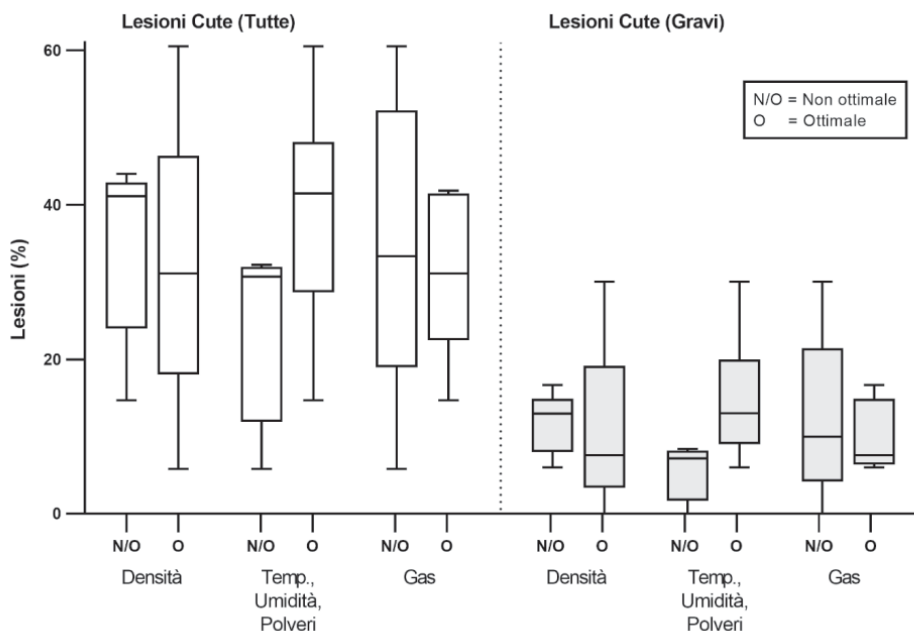


**Figura 2.** Box plot che mettono a confronto la distribuzione delle lesioni alla coda (totali e gravi) di allevamenti con condizioni ottimali (O) e non ottimali (N/O) di densità dei suini, condizioni microclimatiche (temperatura, umidità relativa e polveri) e concentrazione di gas nocivi; le differenze statisticamente significative ( $P < 0,05$ ) sono indicate con un asterisco (\*)

**Figure 2.** Box plots comparing the distribution of tail lesions (total and severe) of farms with optimal (O) and sub-optimal (N/O) conditions of pig density, environmental conditions (temperature, relative humidity and dust) and noxious gas concentration; statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) are marked with an asterisk (\*)

Per quanto riguarda le lesioni alla cute, non sono emerse differenze significative tra gli allevamenti inclusi nello studio (figura 3).





**Figura 3.** *Box plot* che mettono a confronto la distribuzione delle lesioni alla cute (totali e gravi) di allevamenti con condizioni ottimali (O) e non ottimali (N/O) di densità dei suini, condizioni microclimatiche (temperatura, umidità relativa e polveri) e concentrazione di gas nocivi; non sono state rilevate differenze statisticamente significative ( $P < 0,05$ )

**Figure 3.** *Box plots* comparing the distribution of skin lesions (total and severe) from farms with optimal (O) and sub-optimal (N/O) conditions of pig density, environmental conditions (temperature, relative humidity and dust) and concentration of harmful gases; no statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) were found

## DISCUSSIONE

La prevalenza delle lesioni rilevate al macello non è risultata eccessivamente elevata (figura 1). Il 65% delle carcasse non hanno presentato lesioni ed il 25% hanno solo lesioni lievi (score 1) nonostante tutti i capi provenissero da aziende che allevavano suini a coda integra. Tuttavia, come riportato nel nostro studio precedente (Guadagno et al., 2021), la frequenza con cui sono state rilevate queste lesioni sulle carcasse era variabile a seconda dell'allevamento di provenienza. Considerato il campione ridotto di allevamenti (11) è stato possibile investigare solo un numero limitato di fattori che potrebbero aver inciso su tali differenze. In particolare, il campione non è stato sufficientemente numeroso per approfondire l'effetto dei materiali manipolabili; la cui presenza, tipologia e utilizzo potrebbero influenzare significativamente l'incidenza delle lesioni alla coda (Buijs et al., 2019; Wallgren et al., 2019; Chou et al., 2020).

Per quanto concerne la prevalenza delle lesioni cutanee, non sono emerse differenze significative tra le diverse condizioni di allevamento (figura 3). Tale risultato può essere stato condizionato, oltre che dai limiti campionari, dal fatto che i fenomeni di aggressività responsabili di queste lesioni possono verificarsi anche durante il carico/trasporto, sovente per stress e/o rimescolamento di soggetti provenienti da gruppi diversi, e nei box di sosta, in particolare quando gli animali sono costretti a pernottarvi in attesa di essere macellati (Bottacini et al., 2018).

Negli allevamenti inclusi nello studio la densità degli animali non sembra aver inciso sulla frequenza delle lesioni rinvenute al macello (figura 2). Tuttavia, tale associazione, in diversi studi sul suino leggero, ha evidenziato che all'aumentare degli spazi disponibili si riducono le lesioni cutanee e alla coda (EFSA, 2007; Vermeer et al., 2017; Brandt et al., 2020). Il rilievo a fine ciclo sul suino pesante italiano potrebbe aver mitigato questo effetto data la costituzione più solida e duratura dei gruppi di animali oggetto di studio. Tuttavia, si rammenta che un'elevata densità di capi può comunque rappresentare un fattore di rischio per la morsicatura della coda anche nelle aziende che allevano suini pesanti (Scollo et al., 2016). Gli allevamenti con condizioni ottimali di microclima (temperatura, umidità relativa, polverosità) e di concentrazione dei gas nocivi hanno mostrato una ridotta prevalenza delle lesioni alla coda (figura 2), in linea con quanto presente in letteratura, dimostrando che in assenza di un ricambio d'aria adeguato tali lesioni risultano più frequenti (Scollo et al., 2016; Wallgren et al., 2019).

## CONCLUSIONI

Il rilievo delle ABMs al macello come indicatori di benessere in allevamento, costituisce un valido strumento di monitoraggio e, in talune situazioni, può evidenziare potenziali rischi strutturali o manageriali in azienda. I rilievi diretti sugli animali dovrebbero essere adottati di routine al fine di fornire informazioni precise sull'allevamento, sia al fine di perfezionare e rendere maggiormente efficiente la produzione, che per la tutela del benessere animale nella logica di una catena etica della produzione. Considerando il limitato numero di allevamenti coinvolti nel presente studio, i risultati devono considerarsi preliminari e sarà necessario estendere le numerosità, degli allevamenti e dei confronti al fine di stabilire delle soglie ove risulta verosimile la presenza di uno stato di maggior o minor benessere sia in allevamenti con suini a coda integra che a coda mozzata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Arduini A., Redaelli V., Luzi F., Dall'Olio S., Pace V., Nanni Costa L. (2017) "Relationship between Deck Level, Body Surface Temperature and Carcass Damages in Italian Heavy Pigs after Short Journeys at Different Unloading Environmental Conditions". *Animals (Basel)* **7**, 10.
2. Bottacini M., Scollo A., Edwards S.A., Contiero B., Veloci M., Pace V., Gottardo F. (2018) "Skin lesion monitoring at slaughter on heavy pigs (170 kg): Welfare indicators and ham defects". *PLoS One* **13**, e0207115.
3. Brandt P., Hakansson F., Jensen T., Nielsen M.B.F., Lahrmann, H.P., Hansen C.F., Forkman B. (2020) "Effect of pen design on tail biting and tail-directed behaviour of finishing pigs with intact tails". *Animal* **14**, 1034-1042.
4. Buijs S., Muns R. (2019) "A review of the effects of non-straw enrichment on tail biting in pigs". *Animals (Basel)* **9**, 824.
5. Chou J.Y., Sandercock D.A., D'Eath R.B., O'Driscoll K. (2020) "A High Enrichment Replenishment Rate Reduces Damaging Behaviors and Increases Growth Rate in Undocked Pigs Kept in Fully Slatted Pens". *Front Vet Sci* **7**.
6. ClassyFarm (2018) "Benessere Animale: Linee Guida per la Prevenzione del Taglio della Coda nell'Allevamento Suino dallo Svezamento all'Ingrasso". Disponibile su <http://www.classyfarm.it/wpcontent/uploads/sites/4/2018/08/Manuale-linee-guida-rischio-taglio-coda.pdf> (ultimo accesso 09/03/2020)
7. EFSA – European Food Safety Authority (2005) "Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to welfare of weaners and rearing pigs: effects of different space allowances and floor types". *EFSA J* **268**, 1-19.

8. EFSA – European Food Safety Authority (2007) “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 - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare”. EFSA J 5, 611.
9. EFSA – European Food Safety Authority (2011) “Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine)”. EFSA J 9, 2351.
10. 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 J 10, 1-85.
11. EFSA – European Food Safety Authority (2014) “Scientific opinion concerning a multifactorial approach on the use of animal and non-animal-based measures to assess the welfare of pigs”. EFSA J 12, 1-101.
12. FVO – Food and Veterinary Office (2017) “Final Report of an Audit Carried out in Italy from 13 November 2017 to 17 November 2017 in Order to Evaluate Member State Activities to Prevent Tail-Biting and Avoid Routine Tail-Docking of Pigs”. Disponibile su: [https://ec.europa.eu/food/audits-analysis/act\\_getPDF.cfm?PDF\\_ID=13722](https://ec.europa.eu/food/audits-analysis/act_getPDF.cfm?PDF_ID=13722) (ultimo accesso: 09/03/2020).
13. Guadagno F., Maisano A.M., Scali F., Santucci G., Giudici F., Tonni M., Ianieri A., Ghidini S., Guarneri C., Di Martino G., Scollo A., Castelluccio D., Santucci U., Vitali A., Rusconi C., Campana L., Vezzoli F., Bertocchi L., Alborali G.L. (2020) “Monitoraggio del benessere animale al macello: lesioni alla coda e alla cute in suini pesanti allevati a coda integra”. In: Volume Atti “Meeting Annuale SIPAS 2020” (*in press*).
14. Maisano A.M., Luini M., Vitale N., Nodari S.R., Scali F., Alborali, G. L., Vezzoli, F. (2020) “Animal-based measures on fattening heavy pigs at the slaughterhouse and the association with animal welfare at the farm level: A preliminary study”. Animal 14, 108-118.
15. OIE (2013) “Introduction to the Recommendations for Animal Welfare”. Disponibile su: [https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/?htmlfile=chapitre\\_](https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/?htmlfile=chapitre_aw_introduction.htm)  
[aw\\_introduction.htm](https://www.oie.int/en/standard-setting/terrestrial-code/access-online/?htmlfile=chapitre_aw_introduction.htm) (ultimo accesso: 19/03/2020).
16. Scollo A., Contiero B., Gottardo F. (2016) “Frequency of tail lesions and risk factors for tail biting in heavy pig production from weaning to 170 kg live weight”. Vet J 207, 92-98.
17. Van Staaveren N., Doyle B., Manzanilla E.G., Calderón Díaz J.A., Hanlon A., Boyle L.A. (2017a) “Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs”. J Anim Sci 95, 1528–1536.
18. Van Staaveren N., Teixeira D.L., Hanlon A., Boyle L.A. (2017b) “Pig carcass tail lesions: the influence of record keeping through an advisory service and the relationship with farm performance parameters”. Animal 11, 140–146.
19. Vermeer H.M., Dirx-Kuijken N. C., Bracke M. (2017) “Exploration feeding and higher space allocation improve welfare of growing-finishing pigs”. Animals (Basel) 7, 36.
20. Vom Brocke A., Karnholz C., Madey-Rindermann D., Gauly M., Leeb C., Winckler C., Dippel, S. (2019) “Tail lesions in fattening pigs: Relationships with postmortem meat inspection and influence of a tail biting management tool”. Animal 13, 835-844.
21. Wallgren T., Lundeheim N., Wallenbeck A., Westin R., Gunnarsson S. (2019) “Rearing Pigs with Intact Tails—Experiences and Practical Solutions in Sweden”. Animals (Basel) 9, 812.
22. Welfare Quality (2009). “Welfare Quality® assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and finishing pigs”. Welfare Quality® Consortium, Lelystad, The Netherlands.

## **POSTERS**



# IMPATTO DELLA VACCINAZIONE PER VIA ORALE CON ENTERISOL® ILEITIS IN ALLEVAMENTI D'INGRASSO SUI PARAMETRI DI CRESCITA E SUL CONSUMO DI ANTIBIOTICI

## IMPACT OF ORAL VACCINATION WITH ENTERISOL® ILEITIS ON GROWTH PARAMETERS AND ANTIBIOTIC CONSUMPTION IN FATTENING FARMS

ANTONELLI A.<sup>1</sup>, BIANCHI M.<sup>2</sup>, LEOTTI G.<sup>2</sup>, ANDREONI S.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medico Veterinario DVM

<sup>2</sup>Boehringer Ingelheim Animal Health Italia SpA

**Parole Chiave:** vaccinazione orale per *Lawsonia intracellularis*, parametri produttivi, riduzione dell'uso di antibiotici.

**Key Words:** *Lawsonia intracellularis* oral vaccination, growth parameters, antibiotic reduction

### RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto della vaccinazione con Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), somministrato attraverso l'alimentazione liquida, in suini all'inizio della fase d'ingrasso e destinati alle produzioni DOP, sulle performance produttive e sul consumo di antimicrobici. La prova è stata eseguita in sei allevamenti da ingrasso con presenza di ileite subclinica e/o cronica, con le stesse pratiche gestionali, protocollo alimentare e origine dei lattoni.

È stato eseguito uno studio before/after tra i suini allevati nel 2018 (6 lotti), non vaccinati e i suini allevati nel 2019, (6 lotti) vaccinati contro *Lawsonia intracellularis*.

Sono stati arruolati nello studio un totale di 16.180 suini vaccinati e 16.153 suini non vaccinati. Gli animali vaccinati hanno mostrato una riduzione significativa dell'ICA (3,23 vs 3,32; p = 0,017; Paired T-test) e della mortalità (2,82% vs 3,93%; p < 0,001; Test chi-quadrato). Nel gruppo dei vaccinati, inoltre, il numero di giorni di trattamento antibiotico è risultato significativamente più basso (4,67 giorni vs 23,50 giorni; p = 0,005; Paired T-test).

La vaccinazione per via orale eseguita nell'alimentazione liquida si è dimostrata una valida e pratica alternativa per contribuire a ridurre l'uso di antimicrobici per il controllo delle malattie gastrointestinali e contribuire a migliorare le performance zootecniche nella fase di ingrasso.

### ABSTRACT

The objective of this study was the evaluation of the impact of vaccination with Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), administered through liquid feed, in pigs at the beginning of the fattening phase, on production performance and consumption of antibiotics.

The study was conducted in six fattening farms with subclinical and/or chronic ileitis, with the same management practices, feed and source of weaners.

A before/after study was performed on pigs produced in 2018 (6 batches) vs 2019 (6 batches). The vaccination has been applied in 2019.

A total of 16.180 vaccinated pigs and 16.153 unvaccinated pigs were included in the study. Vaccinated animals showed a significant reduction in FCR (3.23 vs 3.32; p = 0.017; Paired T-test) and mortality (2.82% vs 3.93%; p < 0.001; Chi-square test). The vaccinated group also

shown a significantly lower antibiotic treatment days (4.67 days vs 23.50 days;  $p = 0.005$ ; Paired T-test).

Oral vaccination administered into liquid feeding has proven to be a valid and practical alternative to reduce the use of antibiotics for gastrointestinal diseases and help to improve zootechnical performance in the fattening phase.

## INTRODUZIONE

L'Enteropatia Proliferativa del Suino (PPE) o Ileite, è sostenuta da *Lawsonia intracellularis*, un batterio intracellulare obbligato, Gram negativo anaerobio, che si trasmette prevalentemente per via oro-fecale e infetta gli enterociti del piccolo intestino, principalmente l'ileo, e del colon, limitando l'assorbimento dei nutrienti e dell'acqua (1).

È una patologia infettiva enterica estremamente comune nel suino. A partire dagli anni '70 ha iniziato a diffondersi negli allevamenti intensivi ed è diventata una delle malattie enteriche economicamente più importanti a livello globale (2).

In Italia la prevalenza degli allevamenti sieropositivi è elevata; nel 2006 uno screening condotto su 61 aziende del nord Italia ha evidenziato una prevalenza di allevamenti sierologicamente positivi a *Lawsonia intracellularis* dell'85,3% (3). Il riscontro della forma clinica non è sempre sufficiente ad emettere una diagnosi in quanto tale patogeno non è facilmente isolabile o evidenziabile e spesso sono co-presenti, in tali problematiche, anche altri patogeni intestinali (*Brachyspira spp.*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*) (1).

A livello anatomopatologico si riconoscono diverse forme di PPE tra cui: enteropatia proliferativa emorragica (PHE), adenomatosi intestinale suina (PIA), enterite necrotica (NE) e ileite regionale (RI) (4).

Dal punto di vista clinico, invece, sono descritte tre principali forme della malattia: acuta, cronica e subclinica. La forma acuta, caratterizzata dal riscontro di PHE colpisce più frequentemente suini in età avanzata, dai 4 ai 12 mesi di vita, come scrofette da rimonta, verri e suini all'ingrasso. È caratterizzata da quadri emorragici acuti, anemia e morte improvvisa. Gli animali colpiti presentano diarrea emorragica con feci da rosse a catramose. Le perdite economiche causate dalla forma acuta sono riconducibili soprattutto alla mortalità dei suini, che può raggiungere il 50% degli animali colpiti (1).

La forma cronica, caratterizzata da PIA, solitamente colpisce suini in giovane età nelle fasi di magronaggio e ingrasso (da 6 a 20 settimane di vita) ed è caratterizzata da diarrea non emorragica e riduzione dell'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG). Solitamente presenta valori di mortalità contenuta (1-5%), spesso legati ad altre infezioni concomitanti (1). La forma subclinica, invece, è la meno evidente ed è responsabile di riduzione dell'incremento ponderale, aumento dell'indice di conversione alimentare (ICA) e disomogeneità tra suini dello stesso gruppo, in assenza di segni clinici apprezzabili; quest'ultima è ad oggi la forma più diffusa ed economicamente più rilevante (5).

Il controllo della malattia è da sempre stato basato prevalentemente sull'utilizzo di antibiotici appartenenti alle classi dei macrolidi, tetracicline, pleuromutiline e lincosamidi. (6). La diminuzione dell'uso degli antibiotici negli allevamenti suinicoli rappresenta un bisogno crescente del mercato, in conseguenza delle recenti normative europee e della pressione sempre maggiore dell'opinione pubblica. Il maggiore ricorso alla vaccinazione è percepito come una delle alternative più sostenibili all'uso di antibiotici negli allevamenti suinicoli (7). Dal 2005 è disponibile sul mercato un vaccino vivo attenuato (Enterisol® Ileitis, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH), da somministrarsi per via orale agli animali. Il vaccino stimola un'immunità attiva ed in particolare mucosale nei confronti di *Lawsonia intracellularis*. Tale vaccino è registrato per la riduzione delle lesioni intestinali causate da *Lawsonia intracellularis* e per ridurre gli accrescimenti disomogenei ed il mancato incremento di peso associati alla malattia.



La somministrazione per via orale del vaccino ai suini, a partire dalla 3° settimana di vita, va posizionata circa 3 settimane prima dell'infezione e può essere eseguita individualmente attraverso l'utilizzo di drench o in gruppo, tramite l'acqua di bevanda o attraverso l'alimentazione liquida, grazie ad una recente indicazione specifica.

L'obiettivo di questo studio è stato quindi quello di valutare l'impatto della vaccinazione con Enterisol® Ileitis, somministrato attraverso l'alimentazione liquida, in suini all'inizio della fase d'ingrasso, sulle performance produttive e sul consumo di antibiotici in allevamenti con storia clinica di ileite subclinica e/o cronica.

## MATERIALI E METODI

In questo studio sono stati inclusi sei allevamenti da ingrasso situati in Emilia Romagna che lavorano con un sistema tutto pieno/tutto vuoto (AI/AO) ed effettuano un solo ciclo d'ingrasso all'anno, con accasamento nel mese di gennaio.

Tutti gli allevamenti utilizzavano lo stesso protocollo alimentare e i lattoni provenivano dalle stesse scrofaie, quindi con lo stesso status sanitario. Le pratiche gestionali dei diversi allevamenti erano comparabili tra loro.

Gli allevamenti presentavano una storia clinica diagnosticata di ileite subclinica e/o cronica controllata attraverso l'utilizzo terapeutico di antibiotici.

Nell'anno 2019 è stata inserita la vaccinazione contro *Lawsonia intracellularis* e, per valutarne l'efficacia, si è impostato uno studio di confronto (before/after) tra i suini allevati nel 2018 (6 lotti), non vaccinati, e i suini allevati nel 2019 (6 lotti), vaccinati.

Il vaccino, Enterisol® Ileitis (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) è stato somministrato per via orale nell'alimentazione liquida contestualmente a Thiosulfate Blue (Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH) come stabilizzante, in un unico pasto, all'inizio del periodo di ingrasso (una settimana dopo l'arrivo degli animali).

Sono stati inclusi nello studio un totale di 16.180 suini vaccinati e 16.153 suini non vaccinati distribuiti tra gli allevamenti come in Tabella 1:

| ALLEVAMENTO   | A   | B     | C     | D     | E     | F   | TOTALE |
|---------------|-----|-------|-------|-------|-------|-----|--------|
| N° suini 2019 | 850 | 1.700 | 1.550 | 7.000 | 4.530 | 550 | 16.180 |
| N° suini 2018 | 847 | 1.700 | 1.550 | 7.000 | 4.506 | 550 | 16.153 |

**Tabella 1:** Numero di suini accasati per allevamento nel 2018 e nel 2019

**Table 1:** Number of pigs per farm in 2018 and 2019

I dati raccolti per ogni azienda sono stati i seguenti:

numero suini entrati e usciti, peso medio dei suini in entrata e uscita (Kg), mortalità (%), incremento peso medio giornaliero (IPMG, kg/giorno), indice di conversione alimentare (ICA, Kg/Kg) e giorni totali per ciclo di ingrasso di trattamento antibiotico per patologie gastro-intestinali. I dati sono stati analizzati con Minitab 18 utilizzando il test Chi-quadrato per il confronto delle percentuali di mortalità e il Paired T-test per confrontare le medie degli altri parametri.

## RISULTATI

Andando ad analizzare i dati produttivi raccolti (Tabelle 2-3-4), gli animali vaccinati hanno mostrato una riduzione significativa dell'ICA ( $p = 0,017$ ; Paired T-test) e un IPMG numericamente migliore. L'ICA riscontrato è stato rispettivamente di 3,23 nel gruppo vaccinato e 3,32 nel gruppo non vaccinato (Figura 1), mentre l'IPMG è stato di 0,657 Kg/giorno negli animali vaccinati e di 0,643 Kg/giorno negli animali non vaccinati.

È stata evidenziata inoltre una riduzione significativa della mortalità ( $p < 0,001$ ; Test Chi-quadrato) con valori di 2,82% nei soggetti vaccinati e di 3,93% nei soggetti non vaccinati. Infine, il numero medio di giorni di trattamento per patologie enteriche, nel gruppo dei vaccinati, è stato significativamente più basso: 4,67 giorni contro i 23,50 del gruppo non vaccinati ( $p = 0,005$ ; Paired T-test) (Figura 2).

| <b>Allevamenti 2018</b>                        | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> |
|------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| N° suini entrati                               | 847      | 1700     | 1550     | 7000     | 4506     | 550      |
| Peso medio entrata (Kg)                        | 30,00    | 26,00    | 26,00    | 25,00    | 25,23    | 32,00    |
| N° suini macellati                             | 817      | 1655     | 1483     | 6720     | 4321     | 522      |
| Peso medio macellazione (Kg)                   | 176,00   | 185,00   | 182,00   | 181,00   | 179,80   | 185,00   |
| N° di giorni di terapia per malattie enteriche | 5        | 20       | 20       | 35       | 23       | 38       |
| Mortalità %                                    | 3,54%    | 2,65%    | 4,32%    | 4,00%    | 4,11%    | 5,09%    |
| ICA (Kg)                                       | 3,18     | 3,27     | 3,46     | 3,21     | 3,21     | 3,59     |
| IPMG (Kg/giorno)                               | 0,621    | 0,716    | 0,629    | 0,605    | 0,675    | 0,614    |

**Tabella 2:** Dati produttivi raccolti nei sei allevamenti nel 2018

**Table 2:** Production data collected in the six farms in 2018

| <b>Allevamenti 2019</b>                        | <b>A</b> | <b>B</b> | <b>C</b> | <b>D</b> | <b>E</b> | <b>F</b> |
|------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| N° suini entrati                               | 850      | 1700     | 1550     | 7000     | 4530     | 550      |
| Peso medio entrata (Kg)                        | 34,00    | 26,00    | 23,00    | 23,00    | 23,68    | 26,00    |
| N° suini macellati                             | 824      | 1663     | 1538     | 6780     | 4393     | 525      |
| Peso medio macellazione (Kg)                   | 176,00   | 183,00   | 181,00   | 180,00   | 178,80   | 190,00   |
| N° di giorni di terapia per malattie enteriche | 5        | 5        | 5        | 5        | 0        | 8        |
| Mortalità %                                    | 3,06%    | 2,18%    | 0,77%    | 3,14%    | 3,02%    | 4,55%    |
| ICA (Kg)                                       | 3,15     | 3,25     | 3,33     | 3,15     | 3,00     | 3,54     |
| IPMG (Kg/giorno)                               | 0,667    | 0,660    | 0,632    | 0,677    | 0,749    | 0,558    |

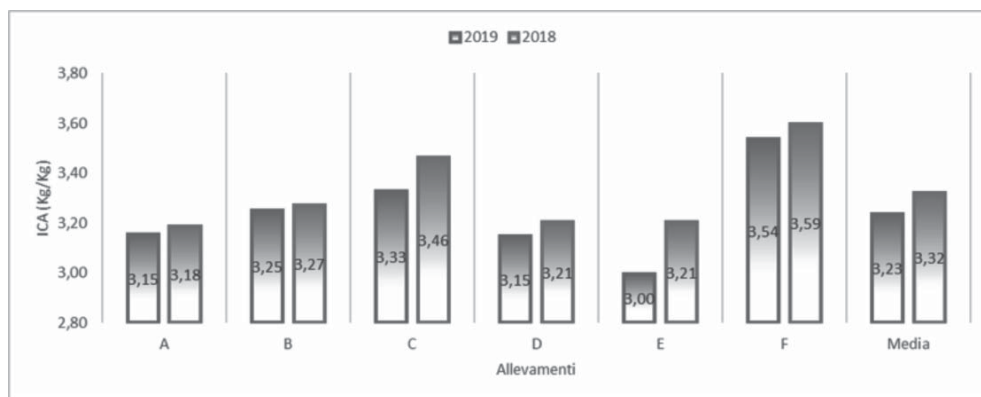
**Tabella 3:** Dati produttivi raccolti nei sei allevamenti nel 2019

**Table 3:** Production data collected in the six farms in 2019

|                                                | <b>Non Vaccinati 2018</b> | <b>Vaccinati 2019</b> | <b>Differenza</b> | <b>Significatività</b> |
|------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|
| N° suini entrati                               | 16.153                    | 16.180                | 27                |                        |
| Peso medio entrata (Kg)                        | 25,76                     | 24,19                 | -1,58             |                        |
| N° suini macellati                             | 15.518                    | 15.723                | 205               |                        |
| Peso medio macellazione (Kg)                   | 181,06                    | 180,20                | -0,86             |                        |
| N° di giorni di terapia per malattie enteriche | 23,50                     | 4,67                  | -18,83            | $p = 0,005$            |
| Mortalità %                                    | 3,93%                     | 2,82%                 | -1,11%            | $p < 0,001$            |
| ICA (Kg)                                       | 3,32                      | 3,23                  | -0,09             | $p = 0,017$            |
| IPMG (Kg/giorno)                               | 0,643                     | 0,657                 | 0,014             |                        |

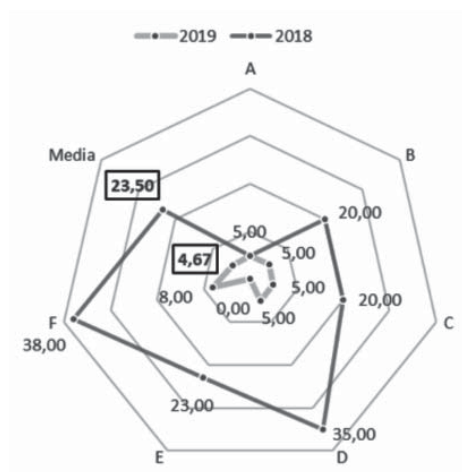
**Tabella 4:** Valori medi dei dati raccolti nei soggetti vaccinati e non vaccinati

**Table 4:** Average data collected in vaccinated and unvaccinated pigs



**Figura 1:** ICA (Kg/Kg) dei sei allevamenti nel 2019 e nel 2018

**Figure 1:** FCR (Kg / Kg) of the six farms in 2019 and 2018



**Figura 2:** Numero dei giorni di trattamento antibiotico per patologie enteriche nei sei allevamenti nel 2019 e nel 2018

**Figure 2:** Number of days of antibiotic treatment for enteric diseases in the six farms in 2019 and 2018

## DISCUSSIONE

In questa esperienza di campo, sono stati messi a confronto i dati produttivi e i consumi di antibiotici di suini allevati in due differenti e consecutivi anni (2018 vs 2019). Tenendo però in considerazione che gli allevamenti e il periodo dell'anno in cui gli animali sono stati allevati era lo stesso, e che l'alimentazione e le pratiche gestionali erano le medesime, si evince, dall'analisi dei dati, che nel gruppo dei vaccinati si è registrato un miglioramento generale delle performance produttive ed in particolare una riduzione significativa dell'ICA e della mortalità. In uno studio analogo sui benefici della vaccinazione eseguito a livello europeo, che coinvolse 130 aziende in 13 paesi (332.000 animali vaccinati vs 387.000 animali non vaccinati), la vaccinazione portò ad una riduzione statisticamente significativa dell'ICA di 0,07, ad un aumento di 35 grammi dell'IPMG e ad una riduzione di 1,44% della mortalità (8). Il presente lavoro sembra riflettere quanto già osservato in altri paesi: in particolare,

la riduzione statisticamente significativa di 0,09 Kg di ICA, che equivale a 13,98 Kg di mangime consumato in meno per animale (9), ed una riduzione della mortalità di 1,11%. Anche in altri lavori simili svolti in Danimarca (10) e Olanda (11), la vaccinazione per via orale contro *Lawsonia intracellularis* permise di ridurre l'utilizzo di antibiotici rispettivamente del 23% e del 92%. Nel nostro studio gli animali non vaccinati sono stati trattati 18,83 giorni in più rispetto ai vaccinati, con una riduzione significativa dei giorni di trattamento per patologie enteriche dell'80,14%.

## CONCLUSIONE

Nell'ottica sempre più attuale di una riduzione dell'utilizzo degli antibiotici negli allevamenti, il maggiore utilizzo delle vaccinazioni è una delle alternative utilizzabili.

La vaccinazione contro *Lawsonia intracellularis* per via orale, eseguita mediante l'alimentazione liquida, può rappresentare una valida e pratica alternativa per contribuire a ridurre l'uso di antibiotici per il controllo delle malattie gastrointestinali, anche nella produzione del suino pesante italiano, e aiutare a migliorare la resa alimentare e i parametri zootecnici degli allevamenti d'ingrasso.

## RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il collega Dr. Andrea Antonelli e il Sig. Daniele Olivi per il contributo tecnico e per la collaborazione in campo, nonché tutti gli allevatori che hanno partecipato allo studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Magistrali C. F. (2013) Capitolo 13: Ileite (enteropatia proliferativa) in: Martelli P. et al. Le patologie del maiale. 1a Ed. PVI, Milano, 491-496.
2. Kroll J., Roof M. B., Hoffman L. J., Dickson J. S. Harris D. L H. (2005). Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal Health Research Reviews*, 6(2), 173-197.
3. Alborali L., Buglisi M., Zanoni M., Salogni C., Guadagnini G., Tranquillo V. (2006). Study on seroprevalence of *Lawsonia intracellularis* in italian swine herds (2006). 19th IPVS Proceedings (Denmark), 194.
4. Bacci B., Morandi F., Ostanello F., Alborali L., Sarli G. (2008). Diagnosi di enteropatia proliferativa suina da *Lawsonia intracellularis*. *Large Animal Review*; 14, 115-118.
5. McOrist S. (2005). Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Veterinary Journal*, 170, 8-9.
6. McOrist (2004). Treatment and Control of ileitis. *Swine Disease Conference for Swine Practitioners*, 50-53.
7. Postma M., Stärk K. DC., Sjölund M., Backhans A., Grosse Beilage E., Lösken S, Belloc C., Collineau L., Iten D, Visschers V., Nielsen E. O., Dewulf J. (2015). Alternatives to the use of antimicrobial agents in pig production: a multi-country expert-ranking of perceived effectiveness, feasibility and return on investment. *Preventive Veterinary Medicine*, 118, 457-466.
8. Adam M., Hardge T., Voets H. (2008). European wide investigation on the economic impact of ileitis vaccination. *Leman Conference*, 36.
9. <https://www.preventionworks.info/en/support-tools/becal>.
10. Bundgaard H., Bak H., Brueggemann D. (2012). How to reduce antimicrobial use in pig production. 22nd IPVS Proceedings (Korea), 200.
11. Kwitten J., Wertenbroek N., Steenaert M. (2014). Reduction of antibiotic use and improvement of production results in a Dutch farrow-to-finish farm after implementation of oral Ileitis vaccination. 23rd IPVS Proceedings (Mexico), (2), 40.

# **CARATTERIZZAZIONE DEI VIRUS INFLUENZALI DI TIPO A ISOLATI DA EPISODI DI INFLUENZA IN ALLEVAMENTI SUINI DEL NORD - ITALIA NEGLI ANNI 2017-2020**

## **CHARACTERIZATION OF INFLUENZA A VIRUSES ISOLATED DURING SWINE INFLUENZA'S OUTBREAKS IN ITALY, 2017-2020**

CHIAPPONI C., PROSPERI A., MORENO A., FACCINI S., ALBORALI G.L., BAIONI L., GABBI V., MANFREDI R., TORREGGIANI C., LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-OIE  
Reference Laboratory for swine influenza*

**Parole chiave:** Virus influenza tipo A, suino

**Key words:** Influenza A, swine

### **ABSTRACT**

Swine IAVs of H1N1, H3N2 and H1N2 subtypes are enzootic in pigs globally, with regionally genetic and antigenic differences. During 2017-2020, 6355 swine IAV outbreaks involving 1448 farms in Northern Italy have been confirmed by RT-PCR for M gene. 666 IAV positive samples were further subtyped by multiplex RT-PCR. 409 positive samples were genetically characterized by full genome sequencing, assigning each virus to its lineage and genotype. The farm prevalence of the different subtypes was: H1N1 40.6% (36.1% H1avN1 and 4.5% H1N1pdm09), 45.7% H1N2 and 12.6% H3N2. In 6 farms (0.9%), two strains co-circulating in the same outbreak were detected. The genetic characterization of the sequenced strains showed that the H1N1 subtypes were of avian-like origin (83,5%) and H1N1pdm09 (13,3%), with a little percentage of reassortant strains (internal genes of pdm09 origin). The H1N2 subtype was the most variable with the circulation of 13 genotypes. The Italian H1N2 (hu-like) was detected in 42,3% of the samples, but in the 57,7% of the detected cases viruses were reassortant H1N2 (pdm09 and av-like internal genes). The H3N2 was confirmed as a stable subtype.

In the last three years high genetic variability was observed in the swine IAVs circulating in Italy. The importance of IAV monitoring is enhanced by the economic impact of swine Influenza in the Porcine Respiratory Disease Complex, but also considering the pig's role as a mixing vessel, generating potentially zoonotic viruses.

### **RIASSUNTO**

I virus influenzali endemici nei suini (swIAV) appartengono ai sottotipi H1N1, H3N2 e H1N2, e presentano differenze genetiche ed antigeniche in base all'origine geografica degli isolati. Nel periodo 2017-2020 sono stati confermati, con RT-PCR per il gene M, 6355 focolai di swIAV, in 1448 allevamenti suini del Nord Italia. Fra questi, 617 campioni positivi sono stati tipizzati mediante multiplex RT-PCR. Inoltre 409 campioni positivi sono stati sequenziati. A livello di azienda, la prevalenza dei sottotipi è stata: 40,6% H1N1 (36,1% H1avN1 e 4,5% H1N1pdm09), 45,3% H1N2 e 12,2% H3N2. In 6 aziende (0,9%) sono stati rilevati due ceppi co-circulanti nello stesso focolaio. Il sottotipo H1N1 maggiormente rappresentato è risultato essere quello di origine av-like (83,5%), seguito da H1N1pdm09 (13,3%), con una piccola percentuale di ceppi riassortanti (geni interni di origine pdm09). Il sottotipo H1N2 è risultato il più variabile, con la circolazione di 13 diversi genotipi. H1N2 (hu-like) è stato rilevato nel 42,3% dei campioni, ma nel 57,7% dei casi i virus erano riassortanti (geni interni

pdm09 e av-like). H3N2 si è confermato il sottotipo più stabile. Negli ultimi tre anni è stata osservata un'elevata variabilità genetica negli swIAV in Italia. L'importanza del monitoraggio di questi virus è legata all'importanza economica dell'influenza come patogeno nell'ambito del Complesso Respiratorio del suino, ma anche al ruolo del suino come serbatoio per virus potenzialmente zoonotici.

## INTRODUZIONE

L'influenza suina è un'importante patologia fra quelle che compongono il complesso PRDC, e può causare significative perdite economiche. L'influenza suina acuta è causata da virus influenzale di tipo A (swIAV), è caratterizzata da un breve periodo di incubazione (1-3 giorni) e si manifesta con febbre, inappetenza, inattività e difficoltà respiratorie. Possono essere osservate congiuntivite, secrezione nasale e starnuti e la morbilità raggiunge rapidamente quasi il 100% del gruppo. La mortalità è bassa e di solito non supera l'1%. Generalmente gli animali guariscono da 5 a 7 giorni dopo l'insorgenza della sintomatologia.

L'infezione da swIAV, oltre ad avere importanti ripercussioni sanitarie, gioca anche un ruolo importante nella ecologia dei virus influenzali, in quanto questa specie è suscettibile alla infezione da parte di virus influenzali aviari ed umani, ed è in grado di trasmetterli ad altre specie (Olsen et al., 2006; Kuntz-Simon and Madec, 2009; Zell et al., 2013).

Il genoma del virus influenzale A è costituito da 8 segmenti di RNA e viene convenzionalmente identificato a seconda delle caratteristiche delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuroaminidasi (NA) (Cheung and Poon, 2007). La peculiare costituzione del genoma di IAV è alla base della sua marcata variabilità antigenica. L'emergenza di un nuovo virus influenzale A può realizzarsi grazie a diversi meccanismi: la trasmissione inter-specie, le mutazioni antigeniche (*drift*) e il riassortimento genetico, dovuto allo scambio di geni tra due o più virus influenzali, anche originati da specie diverse. Nel corso del tempo tutti e tre questi meccanismi hanno condizionato l'evoluzione degli IAV in tutto il mondo, anche se in swIAV il *drift* antigenico, contrariamente a quanto avviene per i virus umani, è quello meno frequentemente osservato (Brown, 2013).

Dopo la pandemia influenzale del 2009, quattro lineaggi di virus swIAV sono diventati enzootici nella popolazione suina europea, vale a dire: H1N1 di origine aviaria o avian-like (H1avN1), H1N1 di origine pandemico 2009 (H1N1pdm09), H1N2 di origine umana o human-like (H1huN2) e H3N2 human-like (H3N2), con frequenze relative che variano da paese a paese (Watson et al., 2015). A partire dal 2009, anche in Italia si è osservata la circolazione del sottotipo A(H1N1)pdm09 (Moreno et al., 2010) e di numerose tipologie di riassortanti di questo stipite con i sottotipi endemici europei (Watson et al., 2015; Chiapponi et al., 2017).

Scopo di questo studio è di riportare informazioni aggiornate sugli swIAV isolati durante focolai di influenza suina in Italia nell'ultimo quadriennio (2017-2020).

## MATERIALI E METODI

Nel periodo 2017-2020 tamponi nasali, tamponi tracheali, fluidi orali, campioni di tessuto polmonare sono stati raccolti da suini affetti da forme cliniche respiratorie in 1448 allevamenti nel Nord Italia, per un totale di 6355 focolai, e testati per swIAV con metodica RT-PCR real-time così come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2017).

Da questi, 617 campioni, provenienti da altrettante aziende positive, sono stati ulteriormente caratterizzati per determinare il sottotipo virale presente tramite tecnica molecolare multiplex end point RT-PCR (LeBlanc et al., 2009; Chiapponi et al., 2010). Una selezione di 409 campioni è stata geneticamente caratterizzata tramite sequenziamento del genoma completo mediante NGS.

Per l'analisi genetica, il genoma è stato analizzato suddiviso nei singoli 8 segmenti genetici

per swIAV. Il lineaggio di ciascun segmento è stato determinato mediante analisi in Blast verso i virus influenzali swIAV presenti in GenBank. I vari genotipi di swIAV scaturiti dalla diversa combinazione di geni sono stati numerati progressivamente così come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2017). Le sequenze geniche sono state allineate con ClustalW usando MEGA10 (Kumar et al., 2018). Gli alberi filogenetici dei segmenti genici sono stati ottenuti con metodo maximum-likelihood (ML) nel software IQ-TREE 0.9.6 con analisi di bootstrap di 1000 campioni (Trifinopoulos et al., 2016).

## RISULTATI

La tipizzazione di 617 campioni, da altrettante aziende positive per swIAV, in RT-PCR multiplex ha evidenziato che, nei quattro anni considerati, il sottotipo H1N2 è stato quello maggiormente rilevato, con una percentuale del 45,7%, seguito dal sottotipo H1N1 con 40,6% (diviso in 36,1% H1avN1 e 4,5% H1N1pdm09) e da H3N2 (12,6%). In 6 allevamenti (0,9%) sono stati rilevati due ceppi circolanti contemporaneamente nello stesso focolaio (Tabella 1). Nel 2020 è stato osservato un incremento di aziende positive per H1N1pdm09 (15%), mentre le rilevazioni di aziende positive per H3N2 si sono portate al 5%.

L'analisi approfondita, eseguita con i dati di sequenziamento, è riassunta in tabella 2. La combinazione dei segmenti genici di ciascun virus è stata identificata con numerazione progressiva e è stata calcolata la percentuale di ciascun genotipo per ogni sottotipo. E' stato così possibile osservare che fra i virus H1N1 circolano emoagglutinine di tre cluster genetici diversi e definiti, sulla base del progenitore genetico, come: HA av-like, HA hu-like e pdm09. Come neuraminidasi sono stati individuati due cluster descritti come av-like e pdm09. A questo si deve aggiungere che diverse combinazioni di geni interni di origine av-like e pdm09 hanno dato origine ai 7 genotipi diversi riscontrati per H1N1. Per quanto riguarda il sottotipo H1N2, si sono osservati due lineaggi di geni per emoagglutina (hu-like e av-like), tre per neuraminidasi, due di origine suina e una di origine umana (hu-like-SCOTL\_94, sw-H3N2-GENT-84, hu-like -Hong-Kong-1997\_H3N2) e due per geni interni (av-like e pdm09). E' interessante sottolineare come nel caso di focolai sostenuti da ceppi H1N2, si siano osservate 13 combinazioni genetiche diverse. Per il sottotipo H3N2 infine si è rilevata la circolazione di un solo tipo di emoagglutina di origine suina, di un solo tipo di neuraminidasi N2 (sw-H3N2-GENT-84) e di geni interni di origine aviare. Unica eccezione è stato l'isolamento di un virus H3N1 che rappresenta un episodio sporadico di riassortimento di geni codificanti per proteine di superficie per il sottotipo H3.

**Tabella 1.** Percentuali di identificazione dei diversi sottotipi mediante RT-PCR multiplex negli anni considerati

**Table 1.** Identification percentages of the different IAV subtypes by multiplex RT-PCR in the years 2017-2020

| Ceppo Anno | H1N1  | H1N2  | H3N2  | H3N1 | H1N1 pdm09 | Misti | Totale tipizzati |
|------------|-------|-------|-------|------|------------|-------|------------------|
| 2017       | 41,9% | 40,9% | 15,1% | 0,0% | 0,5%       | 2,2%  | 186              |
| 2018       | 36,6% | 47,9% | 12,4% | 0,7% | 0,7%       | 0,0%  | 153              |
| 2019       | 32,6% | 44,7% | 17,4% | 0,8% | 4,5%       | 0,0%  | 132              |
| 2020       | 31,1% | 48%   | 5,4%  | 0,0% | 13,5%      | 2%    | 146              |
| tot        | 36,1% | 45,7% | 12,6% | 0,3% | 4,5%       | 0,7%  | 617              |



**Tabella 2.** Identificazione progressiva e prevalenza dei vari genotipi all'interno di ciascun sottotipo sequenziato. Sono stati evidenziati i genotipi maggiormente circolanti per ciascun sottotipo. H1AV: H1 av-like; H1HU: H1 hu-like.

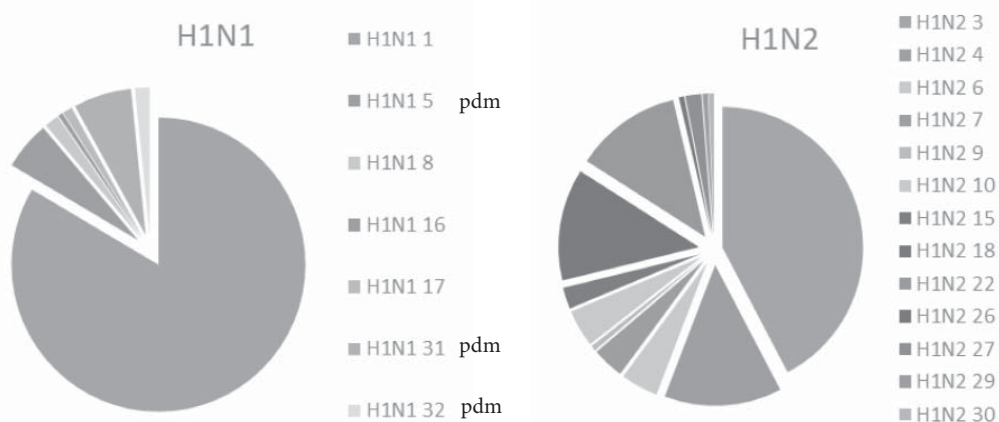
**Table 2** Progressive identification and prevalence of genotypes belonging to each IAV subtype sequenced. The most frequently identified genotypes are evidenced in grey. H1AV: H1 av-like; H1HU: H1 hu-like.

| SOTTOTIPO | genotipo               | %    | HA    | NA                          | PB2     | PB1     | PA      | NP      | M       | NS      |
|-----------|------------------------|------|-------|-----------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| H1N1      | 1                      | 83,5 | H1AV  | AV-LIKE                     | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 8                      | 1,6  | H1AV  | AV-LIKE                     | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 16                     | 0,5  | H1HU  | AV-LIKE                     | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 17                     | 1,1  | H1AV  | AV-LIKE                     | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
|           | 5<br>(H1N1<br>pdm 09)  | 5,3  | PDM09 | PDM09                       | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
|           | 31<br>(H1N1<br>pdm 09) | 6,4  | PDM09 | AV-LIKE                     | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 32<br>(H1N1<br>pdm 09) | 1,6  | PDM09 | AV-LIKE                     | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
| H1N2      | 3                      | 42,3 | H1HU  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 4                      | 13,5 | H1AV  | SW-H3N2-GENT-84             | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 6                      | 4,3  | H1AV  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 7                      | 3,7  | H1HU  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
|           | 9                      | 0,6  | PDM09 | SW-H3N2-GENT-84             | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
|           | 10                     | 4,3  | H1HU  | SW-H3N2-GENT-84             | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 15                     | 2,5  | H1AV  | SW-H1N2-SCOLTAND/1992       | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 18                     | 12,9 | H1AV  | SW-H3N2-GENT-84             | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   |
|           | 22                     | 12,3 | H1AV  | SW-H3N2-GENT-84             | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 26                     | 0,6  | H1AV  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 27                     | 1,8  | H1HU  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 29                     | 0,6  | H1HU  | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | PDM09   | PDM09   | AV-LIKE |
|           | 30                     | 0,6  | PDM09 | HU-LIKE-Hong-Kong-1997_H3N2 | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
| H3Nx      | 2                      | 98,3 | SW-H3 | SW-H3N2-GENT-84             | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |
|           | 28                     | 1,7  | SW-H3 | AV-LIKE                     | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE | AV-LIKE |

Il sottotipo H1N1 per la maggior parte dei virus sequenziati risulta essere di tipo av-like (83,5%), seguito dal sottotipo H1N1pdm09 (13,3% in totale) identificato coi genotipi 5 (5,3%), e i riassortanti 31 (6,4%) e 32 (1,6%), questi ultimi di nuova introduzione. Seguono genotipi riassortanti (geni interni di origine pandemica) che circolano con percentuali tra 1 e 2%. Il sottotipo H1N2 risulta il più variabile, con la circolazione di 13 diversi genotipi. I virus H1N2 italiani hu-like sono rilevati nel 42,3% dei campioni, ma in un totale del 57,7% dei casi rilevati i virus H1N2 hanno origine riassortante (geni interni pandemici e aviari). Il sottotipo H3 si è confermato essere il più stabile, con la sola segnalazione di un virus riassortante H3N1 (genotipo 28).

**Figura 1.** Rappresentazione grafica delle prevalenze dei diversi genotipi per ciascun sottotipo H1N1 e H1N2 influenzale rilevato.

**Figure 1.** Graphic representation of the genotype prevalence for each H1N1, H1N2 IAV subtype detected.



## DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

Negli ultimi tre anni è stata osservata una crescente variabilità genetica negli swIAV circolanti in Italia. Il sottotipo H1huN2 è il più diffuso tra i sottotipi virali e quello geneticamente più variabile e soggetto a riassortimento. L'importanza del monitoraggio della variabilità genetica di swIAV è rafforzata dall'importanza economica dell'influenza nel suino, come agente eziologico di PRDC, ma anche dal ruolo svolto dal suino come *mixing vessel*, in grado di favorire il riassortimento e la genesi di nuovi virus potenzialmente zoonotici. Gli aspetti più interessanti dell'epidemiologia di swIAV nei nostri allevamenti scaturiscono però dall'analisi genetica eseguita su 409 stipiti selezionati. Infatti gli stipiti appartenenti ai tre sottotipi sono stati a loro volta ascritti a ben 22 genotipi diversi, in base all'attribuzione dei lineaggi per ciascun segmento genico considerato (figura 1). Per quanto riguarda gli H1avN1 (genotipo1) si è osservata una consistente circolazione di stipiti di origine Centro-nord Europea (Danimarca, Olanda, Germania). E' rilevante inoltre l'aumentata circolazione di H1N1 con emoagglutinina di origine pandemica con la comparsa nel 2020 di genotipi riassortanti (genotipo31 6,4% e genotipo32 1,6%). La variabilità genetica più accentuata si osserva nell'ambito del sottotipo H1N2; si configura infatti la presenza di 13 genotipi diversi (Figura1). Si conferma presente sul territorio il genotipo3 H1huN2, con HA derivata dal

ceppo di riferimento A/swine/Italy/4675/2003 hu-like (Watson et al., 2015). A questo virus tuttavia si affiancano in numeri crescenti dei genotipi riassortanti, sia di origine italiana (3,7% con il genotipo7) sia di origine europea (12,9% con il genotipo18 e 12,3% con il genotipo22) con emoagglutina di origine aviaria H1avN2 e geni interni di origine A(H1N1)pdm09. I geni di origine pandemica infatti circolano con maggiore frequenza come geni codificanti per proteine interne al virus, contribuendo a generare nuove combinazioni di riassortanti.

Come inizialmente osservato a partire dal 2015 (Chiapponi et al., 2017), possiamo documentare la consistente circolazione e incidenza nell'ambito degli isolati complessivi di virus nord europei. Tale osservazione trova ragione nella valutazione della entità delle introduzioni in Italia di suini vivi da paesi quali Olanda, Danimarca e Germania negli ultimi tre anni. Questa concomitante esposizione a diversi swIAV aumenta la probabilità di coinfezioni, favorendo il riassortimento dei genomi, portando alla nascita di nuovi virus. Alcuni stipiti riassortanti sono identificati sporadicamente, ma talvolta possono adattarsi nella popolazione suina, e negli ultimi anni sono stati evidenziati localmente esempi di nuovi swIAV circolanti. In conclusione, la diversità genetica e antigenica degli swIAV nella popolazione suina europea è notevolmente aumentata negli ultimi anni, sollevando dubbi sulle conseguenze future, e sulle potenziali ripercussioni sulla salute umana. I nuovi virus possono avere un impatto enorme sulla sanità animale, poiché possono potenzialmente avere una maggiore patogenicità, possono essere difficilmente identificabili mediante gli strumenti diagnostici classici e possono sfuggire alla protezione conferita dai vaccini attualmente presenti in commercio. Inoltre, anche le implicazioni per la salute pubblica devono essere attentamente considerate, poiché gli swIAV hanno un potenziale zoonotico, come verificatosi nel corso dell'ultima pandemia del 2009, dovuta a un virus multi-riassortante di origine suina. Pertanto, oggi, una delle principali sfide è comprendere meglio l'evoluzione dei virus influenzali all'interno delle popolazioni suine, attraverso il monitoraggio dei virus circolanti ed un costante aggiornamento delle metodiche diagnostiche e degli strumenti impiegati, anche nel rispetto del concetto di *One Medicine - One Health*.

*Lo studio è stato eseguito in parte con finanziamento Ricerca Corrente Progetto PRC2018009*

## BIBLIOGRAFIA

1. Brown, I.H., (2013). History and epidemiology of Swine influenza in Europe. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **370**: 133-146.
2. Cheung, T.K., Poon, L.L., (2007). Biology of influenza A virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1102**: 1-25.
3. Chiapponi, C., Ebranati, E., Pariani, E., Faccini, S., Luppi, A., Baioni, L., Manfredi, R., Carta, V., Merenda, M., Affanni, P., Colucci, M.E., Veronesi, L., Zehender, G., Foni, E., (2017 ).Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy during 2010-2015 *Zoonoses Public. Health.* .
4. Chiapponi, Chiara, Barbieri, Ilaria and Foni, Emanuela. (2010).MULTIPLEX RT-PCR FOR RAPID SUBTYPING OF HEMAGGLUTININ GENE OF ITALIAN SWINE INFLUENZA VIRUS.Proceedings of the 1<sup>st</sup> Congress of Veterinary Laboratory Diagnosticians (EAVLD),2010.
5. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**: 1547-1549.
6. Kuntz-Simon, G., Madec, F., (2009). Genetic and antigenic evolution of swine influenza viruses in Europe and evaluation of their zoonotic potential. *Zoonoses Public. Health.* **56**: 310-325.

7. LeBlanc, J.J., Li, Y., Bastien, N., Forward, K.R., Davidson, R.J., Hatchette, T.F., (2009). Switching gears for an influenza pandemic: validation of a duplex reverse transcriptase PCR assay for simultaneous detection and confirmatory identification of pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *J. Clin. Microbiol.* 47:3805-3813.
8. Moreno, A., Di Trani, L., Alborali, L., Vaccari, G., Barbieri, I., Falcone, E., Sozzi, E., Puzelli, S., Ferri, G., Cordioli, P., (2010). First Pandemic H1N1 Outbreak from a Pig Farm in Italy. *Open Virol. J.* 4: 52-56.
9. Olsen, C.W., Brown, I.H., Easterday, B.C., Van Reeth, K., (2006 ). Swine influenza Straw BE.
10. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., Minh, B.Q., (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44: W232-5.
11. Watson, S.J., Langat, P., Reid, S.M., Lam, T.T., Cotten, M., Kelly, M., Van Reeth, K., Qiu, Y., Simon, G., Bonin, E., Foni, E., Chiapponi, C., Larsen, L., Hjulsager, C., Markowska-Daniel, I., Urbaniak, K., Durrwald, R., Schlegel, M., Huovilainen, A., Davidson, I., Dan, A., Loeffen, W., Edwards, S., Bublot, M., Vila, T., Maldonado, J., Valls, L., ESNIP3 Consortium, Brown, I.H., Pybus, O.G., Kellam, P., (2015). Molecular Epidemiology and Evolution of Influenza Viruses Circulating within European Swine between 2009 and 2013. *J. Virol.* 89: 9920-9931.
12. 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.



# **PATTERN DI RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI *E. COLI* ENTEROTOSSIGENI (ETEC) E CEPPI DI *E. COLI* COMMENSALI ISOLATI IN SUINETTI CON DIARREA NEONATALE**

## ***ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS OF ENTEROTOXIGENIC E. COLI (ETEC) AND COMMENSAL E. COLI STRAINS ISOLATED IN PIGLETS WITH NEONATAL DIARRHOEA***

DE LORENZI G., ALBORALI G.L., BALDO V., TONNI M., GIOVANNINI S.,  
SCABURRI A., CERIOLI M.P., BELLINI S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER),  
Brescia, Italy*

**Parole chiave:** Antimicrobico resistenza, Diarrea neonatale, ETEC

**Key words:** Antimicrobial resistance, Neonatal diarrhoea, ETEC

### **RIASSUNTO**

In questo studio sono stati inclusi 272 ceppi di *E. coli* isolati da carcasse, feci e tamponi rettali di suinetti con diarrea neonatale conferiti presso l'IZSLER di Brescia tra gennaio 2017 e dicembre 2018. I ceppi sono stati genotipizzati utilizzando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie (F4, F5, F6, F18, F41) e le tossine (STa, STb, LT e Stx2e). I ceppi con fimbrie e tossine (n. 50) sono stati classificati come ETEC, mentre i ceppi non genotipizzabili (n. 222) sono stati classificati come ceppi commensali. La suscettibilità ad un pannello di antibiotici è stata testata per i ceppi ETEC e i ceppi commensali mediante antibiogramma con metodo Kirby – Bauer seguendo le procedure del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I ceppi sono stati classificati suscettibili, intermedi o resistenti interpretando le zone di inibizione di crescita. Gli ETEC hanno mostrato un maggior tasso di resistenza ad ampicillina (94%), tetraciclina (92%), kanamicina (66%), trimetoprim + sulfametossazolo (63%) ed enrofloxacin (56%), mentre i commensali hanno evidenziato elevati livelli di resistenza ad ampicillina (94%), tetraciclina (88%), trimetoprim + sulfametossazolo (73%), enrofloxacin (65%), cefazolina (57%) e kanamicina (51%). Il 78% dei ceppi ETEC e l'80% dei ceppi commensali sono risultati multi-resistenti. I risultati di questo studio mostrano un elevato tasso di resistenze agli antimicrobici testati, suggerendo l'importanza del monitoraggio della resistenza agli antimicrobici, in particolare a quelli di importanza critica per l'uomo.

### **ABSTRACT**

In the period between January 2017 and December 2018, 272 *E. coli* strains were isolated from intestines and faecal swabs of piglets with neonatal diarrhoea belonging to Italian pig herds in Northern Italy. Among these isolates, 50 were identified as ETEC by multiplex PCR for virulence factors (F4, F5, F6, F18, F41, STa, STb, LT and Stx2e), while 222, negative for virulence factors were considered commensal strains. Pathogenic and commensals *E. coli* were analysed for their susceptibility to a standard panel of antimicrobials using the disc diffusion method, following the procedures of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). All strains were classified as sensitive, resistant or intermediate to the antimicrobials by interpreting the zones of growth inhibition. The highest resistance

rates in ETEC were found for ampicillin (94%), tetracyclin (92%), kanamycin (66%), trimethoprim + sulphamethoxazole (63%), enrofloxacin (56%), and, while in commensal *E. coli* the highest resistance rates were found for ampicillin (94%), tetracyclin (88%), trimethoprim + sulphamethoxazole (73%), enrofloxacin (65%), cephazolin (57%), and kanamycin (51%). Multi-drug resistance was observed in ETEC (78%) and commensal isolates (80%). The results of this study show a high rate of resistance to the tested antimicrobials, suggesting the importance of monitoring resistance to antimicrobials, in particular to those of critical importance for humans.

## INTRODUZIONE

*E. coli* costituisce parte della flora batterica autoctona dell'intestino del suino e comprende ceppi commensali e ceppi patogeni. Questi ultimi, in presenza di fattori predisponenti legati all'ospite e all'ambiente, possono causare la comparsa di malattia. Tra i ceppi di *E. coli* patogeni, i ceppi enterotossigeni (ETEC) rappresentano una delle principali cause di diarrea neonatale e un'importante causa di perdite economiche nell'allevamento suino. Questa malattia colpisce generalmente gli animali nella prima settimana di vita, momento in cui i suinetti sono esposti ad un ambiente contaminato dalla flora batterica della madre. La morbilità è generalmente variabile (dal 30% all'80%) e la mortalità può interessare fino al 70% della nidiata (Merialdi, 2013). I suinetti presentano diarrea secretoria e conseguente disidratazione, mentre in alcuni la malattia ha un decorso iperacuto e può causare morte improvvisa. In presenza di fattori di rischio predisponenti, tra i quali i più importanti riguardano il livello di immunità passiva trasferito dalla madre ai suinetti attraverso il colostro e soprattutto il latte (basso titolo di anticorpi specifici nel colostro e nel latte che inibiscano l'adesione di *E. coli* patogeni all'intestino) e temperatura ambientale inferiore a 25°C, i ceppi ETEC agenti di diarrea neonatale possono prendere il sopravvento sulle altre popolazioni batteriche presenti a livello intestinale divenendo preponderanti. In queste condizioni i ceppi ETEC sono in grado di aderire e colonizzare la mucosa del piccolo intestino e di produrre le tossine che alterano il flusso acqua-elettroliti nel piccolo intestino, determinando la comparsa di diarrea. L'adesione a recettori specifici localizzati sulle cellule epiteliali è mediata da fimbrie o fattori di adesione localizzati sulla superficie del batterio. Gli antigeni fimbriali che si rinvenivano più frequentemente nei ceppi ETEC agenti di diarrea neonatale nel suino sono F4 (K88), F5 (K99), F6 (K987P) e F41 (Fairbrother e Nadeau, 2019) e producono generalmente la tossina termostabile STa. La terapia della colibacillosi si basa sulla somministrazione di antibiotici in grado di raggiungere concentrazioni terapeutiche nel lume intestinale. Tuttavia il successo della terapia antibiotica è reso incerto dalla diffusa presenza di antibiotico-resistenze nei confronti degli antimicrobici comunemente impiegati nella terapia della colibacillosi del suino, come dimostrato da uno studio recentemente condotto in Italia (Luppi et al., 2013). I ceppi di *E. coli* commensali e patogeni possono acquisire resistenza agli antimicrobici utilizzati nel trattamento delle patologie nel suino e i ceppi commensali possono fungere da serbatoio di geni di resistenza per i ceppi patogeni (Blake et al., 2003a; Blake et al., 2003b; Kim et al., 2005). Per queste ragioni *E. coli* rappresenta un valido modello di studio sulla diffusione dell'antibiotico resistenza sia in medicina umana che in medicina veterinaria (Schierack et al., 2009).

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare e comparare la resistenza agli antimicrobici di ceppi di *E. coli* enterotossigeni (ETEC) e ceppi di *E. coli* commensali isolati in suinetti con diarrea neonatale provenienti da aziende di riproduzione (siti 1) nel nord Italia.



## MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono stati inclusi 272 ceppi di *E. coli* isolati da feci, tamponi rettali e intestini di suinetti con diarrea neonatale conferiti alla sezione diagnostica di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) nel periodo compreso tra gennaio 2017 e dicembre 2018. I focolai di diarrea neonatale si erano verificati in aziende da riproduzione (siti 1) nel Nord Italia.

Le feci, i tamponi rettali e il contenuto intestinale sono stati seminati su terreno Agar sangue al 5% ed incubati a 37°C per 24 ore in ambiente aerobio. Dopo il periodo di incubazione è stata eseguita una valutazione morfologica delle colonie cresciute su Agar sangue e la conferma biochimica. I ceppi di *E. coli* isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie (F4, F5, F6, F18 e F41) e le tossine (STa, STb, LT e Stx2e) (Casey e Bosworth, 2009). La suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *E. coli* isolati è stata testata mediante antibiogramma con metodo Kirby – Bauer seguendo le procedure del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) utilizzando un pannello di 9 antimicrobici che comprende: ampicillina, amoxicillina + acido clavulanico, cefazolina, enrofloxacin, florfenicolo, gentamicina, kanamicina, tetraciclina e trimetoprim + sulfametossazolo. I ceppi sono stati classificati suscettibili, intermedi o resistenti dopo misurazione delle zone di inibizione di crescita in accordo con il CLSI.

## RISULTATI

Sul totale di 272 ceppi di *E. coli* isolati, la genotipizzazione mediante multiplex PCR ha permesso di individuare 50 ceppi ETEC, positivi per i fattori di virulenza, mentre i restanti 222 ceppi, negativi per i fattori di virulenza, sono stati considerati ceppi commensali. La tabella 1 mostra i virotipi e la prevalenza dei ceppi ETEC inclusi in questo studio. I risultati della suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi ETEC sono riportati in Tabella 2. I risultati della suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* commensali sono riportati in Tabella 3.

**Tabella 1.** Virotypi prevalenti tra i 50 ceppi ETEC isolati in focolai di diarrea neonatale in Nord Italia tra gennaio 2017 e dicembre 2018.

**Table 1.** Prevalent virotypes among the 50 ETEC strains isolated from neonatal diarrhoea outbreaks in Northern Italy from January 2017 to December 2018.

| Virotypi                                       | Prevalenza |
|------------------------------------------------|------------|
| F4, STa, STb                                   | 4%         |
| F4, F41, STb, LT                               | 6%         |
| F4, STb, LT                                    | 6%         |
| F4, F18, STa, STb                              | 8%         |
| F5, STa                                        | 14%        |
| F5, F41                                        | 28%        |
| STa, STb (fattori di adesione non determinati) | 34%        |

**Tabella 2.** Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi ETEC. I tassi di resistenza più elevati sono evidenziati in grigio.

**Table 2.** ETEC antimicrobial susceptibility. The highests resistance rates are highlighted in gray.

| Antibiotico                  | N. tot campioni | N. ceppi sensibili | N. ceppi intermedi | N. ceppi resistenti | % Ceppi sensibili | % Ceppi intermedi | % Ceppi resistenti |
|------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Amoxicillina + AcClavulanico | 48              | 37                 | 5                  | 6                   | 77%               | 10%               | 13%                |
| Ampicillina                  | 18              | 1                  | 0                  | 17                  | 6%                | 0%                | 94%                |
| Cefazolina                   | 20              | 8                  | 1                  | 11                  | 40%               | 5%                | 55%                |
| Enrofloxacin                 | 50              | 20                 | 2                  | 28                  | 40%               | 4%                | 56%                |
| Florfenicolo                 | 50              | 29                 | 5                  | 16                  | 58%               | 10%               | 32%                |
| Gentamicina                  | 50              | 29                 | 0                  | 21                  | 58%               | 0%                | 42%                |
| Kanamicina                   | 41              | 13                 | 1                  | 27                  | 32%               | 2%                | 66%                |
| Tetraciclina                 | 50              | 3                  | 1                  | 46                  | 6%                | 2%                | 92%                |
| Trimetoprim + Sulfonamidi    | 43              | 16                 | 0                  | 27                  | 37%               | 0%                | 63%                |

**Tabella 3.** Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* commensali, negativi per i fattori di virulenza. I tassi di resistenza più elevati sono evidenziati in grigio.

**Table 3.** *E. coli* commensal strains antimicrobial susceptibility. The highests resistance rates are highlighted in gray.

| Antibiotico                  | N. tot campioni | N. ceppi sensibili | N. ceppi intermedi | N. ceppi resistenti | % Ceppi sensibili | % Ceppi intermedi | % Ceppi resistenti |
|------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Amoxicillina + AcClavulanico | 211             | 132                | 34                 | 45                  | 63%               | 16%               | 21%                |
| Ampicillina                  | 104             | 5                  | 1                  | 98                  | 5%                | 1%                | 94%                |
| Cefazolina                   | 104             | 30                 | 15                 | 59                  | 29%               | 14%               | 57%                |
| Enrofloxacin                 | 222             | 66                 | 10                 | 146                 | 30%               | 5%                | 65%                |
| Florfenicolo                 | 222             | 128                | 26                 | 68                  | 58%               | 12%               | 31%                |
| Gentamicina                  | 222             | 141                | 1                  | 80                  | 64%               | 0%                | 36%                |
| Kanamicina                   | 176             | 78                 | 9                  | 89                  | 44%               | 5%                | 51%                |
| Tetraciclina                 | 222             | 19                 | 6                  | 197                 | 9%                | 3%                | 88%                |
| Trimetoprim + Sulfonamidi    | 222             | 58                 | 3                  | 161                 | 26%               | 1%                | 73%                |

I tassi di resistenza più elevati dei ceppi ETEC sono stati osservati per ampicillina (94%), tetraciclina (92%), kanamicina (66%), trimetoprim + sulfametossazolo (63%) ed enrofloxacin (56%) mentre i ceppi di *E. coli* commensali hanno mostrato maggiori tassi di resistenza per ampicillina (94%), tetraciclina (88%), trimetoprim + sulfametossazolo (73%), enrofloxacin (65%), cefazolina (57%) e kanamicina (51%).

In questo studio sono stati inoltre osservati alti tassi di multi-resistenza. Il 78% dei ceppi ETEC e l'80% dei ceppi commensali sono risultati infatti resistenti a 3 o più antimicrobici.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata valutata la suscettibilità agli antimicrobici principalmente utilizzati nel trattamento della colibacillosi neonatale di ceppi di *E. coli* ETEC e di ceppi di *E. coli* commensali. In accordo con i dati bibliografici più recenti, i risultati mostrano elevati tassi di resistenza dei ceppi ETEC e commensali ad: ampicillina, cefazolina, enrofloxacin, kanamicina, tetraciclina e all'associazione sulfamidico + trimetoprim. In uno studio condotto in Italia con l'obiettivo di valutare l'andamento della resistenza di ceppi ETEC isolati in un periodo di 10 anni (2002–2011), i ceppi isolati avevano mostrato un andamento statisticamente significativo all'incremento della resistenza ad enrofloxacin, flumequina e cefquinome. Una resistenza crescente (non statisticamente significativa) era stata osservata anche nei confronti di gentamicina, apramicina e all'associazione sulfamidico + trimetoprim (Luppi et al., 2015). La resistenza all'enrofloxacin è stata descritta in ceppi di *E. coli* isolati in Brasile, in cui il 30% dei ceppi isolati da casi di colibacillosi neonatale sono risultati resistenti (Costa et al., 2010). La resistenza ai fluorochinoloni in particolare è fortemente correlata alla quantità di farmaco utilizzato e al trasferimento da parte di plasmidi di geni di resistenza (Barton, 2014). La resistenza alle beta-lattamine e all'associazione sulfamidico + trimetoprim è stata largamente riportata nella colibacillosi nel suino, così come nei ceppi di *E. coli* commensali isolati sia da suini che da campioni ambientali (Costa et al., 2006; Lu et al. 2010). I risultati di questo studio hanno messo in evidenza un elevato tasso di multi-resistenza tra i ceppi isolati. Il 78% dei ceppi ETEC è risultato resistente a 3 o più antibiotici testati, mentre un tasso di multi-resistenza pari all'80% è stato osservato nei ceppi commensali.

Gli antimicrobici sono stati ampiamente utilizzati nell'allevamento intensivo del suino a scopo terapeutico, metafilattico e profilattico e la conseguente pressione selettiva ha intensificato il rischio di comparsa di batteri resistenti (Jensen et al., 2006; Kozak et al., 2009).

Considerando la relazione esistente tra l'uso degli antimicrobici negli animali da reddito e l'antimicrobico-resistenza nell'uomo, tale problematica richiede un approccio integrato in un'ottica "One Health" volto alla riduzione del consumo di antimicrobico sia in campo umano che in medicina veterinaria.

I risultati ottenuti in questo studio costituiscono un motivo di preoccupazione sia in ambito di salute umana, per il possibile trasferimento di geni di resistenza da ceppi suini a ceppi umani, sia in ambito di sanità animale. I ceppi multi-resistenti, infatti, creano non poche problematiche in termini di approccio terapeutico, rendendo difficoltoso il controllo della colibacillosi a livello aziendale. La diffusione dell'antimicrobico-resistenza nei ceppi di *E. coli* patogeni e nei ceppi commensali è collegata alla presenza di un elevato numero di geni di resistenza (Boerlin et al., 2005). Lo sviluppo di resistenze da parte di ceppi di *E. coli* patogeni e commensali ad un ampio range di antibiotici utilizzati nell'allevamento suinicolo e la presenza di resistenze nei ceppi commensali agli antibiotici di importanza critica per l'uomo, rappresentano una fonte di preoccupazione a livello globale (Brisola et al., 2019). In particolare, l'elevato tasso di resistenza all'enrofloxacin evidenziato in questo studio costituisce motivo di preoccupazione, considerando il ruolo essenziale dei fluorochinoloni nel trattamento delle infezioni nell'uomo. Nelle enterobatteriacee uno dei principali meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni, agli antibiotici betalattamici e alle cefalosporine è mediato da plasmidi che possono conferire resistenza a ceppi patogeni, sia negli animali, che nell'uomo. I risultati di questo studio suggeriscono l'importanza di continuare a monitorare la resistenza agli antimicrobici di ceppi patogeni e ceppi commensali, in particolare a quelli di importanza critica per l'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barton M.D. (2014) "Impact of antibiotic use in the swine industry". *Curr Opin Microbiol.* 19, 9–15.
2. Blake D.P., Hillman K., Fenlon D.R., Low J.C. (2003) "Transfer of antibiotic resistance

- between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions". *J Appl Microbiol.* 95, 428-436. A
3. Blake D.P., Humphry R.W., Scott K.P., Hillman K., Fenlon D.R., Low J.C. (2003) "Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations". *J Appl Microbiol.* 94, 1087-97. B
  4. Boerlin P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Janecko N., Lim H., Nicholson V., McEwen S.A., Friendship R., Archambault M. (2005) "Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario". *Appl Environ Microbiol.* 71, 6753-6761.
  5. Burch, D. G. S. (2013) "Antimicrobial Drug use in swine" in Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. "Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine", 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell. Iowa State University Press.
  6. Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine". *J Vet Diagn Invest.* 21, 25-30.
  7. CLSI M31-A3: Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility tests for Bacteria isolated From Animals; Approved Standards – Third Edition, vol. 28 n. 8, 2008.
  8. Costa M.M., Silva M.S., Spricigo D.A., Witt N.M., Marchioro S.B., Kolling L., Vargas A.P.C. (2006) "Epidemiology, molecular characterization and resistance to antimicrobials of *Escherichia coli* isolated from South-Brazilian pig herds". *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 26, 5-8.
  9. Costa M.M., Drescher G., Maboni F., Weber S.S., Schrank A., Vainstein M.H., et al. (2010) "Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms". *Arg Bras Med Vet Zootec.* 62, 30-36.
  10. Fairbrother J.M. and Nadeau E. (2019) "Colibacillosis" in: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J. "Diseases of swine", 11a ed., UK: Wiley-Blackwell, 807-817.
  11. Jensen V.F., Jakobsen L., Emborg H.D., Seyfarth A.M., Hammerum A.M. (2006) "Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*". *J Antimicrob Chemother.* 58, 101-107.
  12. Kim L.M., Gray J.T., Harmon B.G., Jones R.D., Fedorka-Cray P.J. (2005) "Susceptibility of *Escherichia coli* from growing piglets receiving antimicrobial feed additives". *Foodborne Pathog Dis.* Winter. 2, 304-316.
  13. Kozak G.K., Boerlin P., Janecko N., Reid-Smith R.J., Jardine C. (2009) "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada". *Appl Environ Microbiol.* 75, 559-566.
  14. Lu L., Dai L., Wang Y., Wu C., Chen X., Li L., Qi Y., Xia L., Shen J. (2010) "Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China". *Acta Trop.* 113, 20-25.
  15. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Gherpelli Y., Biasi G., Merialdi G., et al. (2015) "Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy". *Transbound Emerg Dis.* 62, 67-71.
  16. Merialdi G. (2013) "Colibacillosi" in: Martelli P. "Le patologie del maiale", Point Veterinaire Italie, Milano, 453-464.
  17. Schierack P., Kadlec K., Guenther S., Filter M., Schwarz S., Ewers C., Wieler L.H. (2009) "Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group". *Gut Pathog.* 1, 18.

# ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DI ACIDI ORGANICI E COMPOSTI NATURALI IDENTICI PER IL CONTROLLO DI *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NEL SUINO

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ORGANIC ACIDS AND NATURE IDENTICAL COMPOUNDS TO CONTROL *SALMONELLA TYPHIMURIUM* IN SWINE

GIOVAGNONI G.<sup>1</sup>, TUGNOLI B.<sup>2</sup>, PIVA A.<sup>1,2</sup>, GRILLI E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;

<sup>2</sup> Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia;

<sup>3</sup> Vetagro Inc., 116 W. Jackson Blvd., Suite #320, 60604, Chicago, IL, USA

**Parole chiave:** *Salmonella typhimurium*, composti bioattivi, additivi per mangimi

**Key Words:** *Salmonella typhimurium*, bioactive compounds, feed additives

### RIASSUNTO

L'obiettivo di questo studio è stato di indagare l'efficacia di composti bioattivi nell'inibizione e nel controllo di *Salmonella typhimurium* ATCC® 6994™ *in vitro*. L'attività antimicrobica di acidi organici (acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico) e composti naturali identici (timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo) è stata valutata attraverso un MIC test in microdiluizione. Tutti i composti naturali identici sono risultati efficaci nell'inibizione della crescita batterica ed in particolare timolo e carvacrolo hanno mostrato le MIC più basse tra tutte le sostanze analizzate (1.87 mM). Tra gli acidi organici, acido sorbico, benzoico ed esanoico presentavano una MIC di 100 mM. Timolo, carvacrolo ed acido sorbico sono stati selezionati per uno studio time-kill, da cui è emersa l'azione battericida dei due composti naturali identici e l'azione batteriostatica dell'acido sorbico. I risultati di questo studio indicano che questi composti bioattivi possono quindi essere utilizzati come additivi per mangimi nel controllo di *Salmonella typhimurium* nel suino.

### ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the efficacy of bioactive compounds in the inhibition and control of *Salmonella typhimurium* ATCC® 6994™ *in vitro*. The antimicrobial activity of organic acids (citric acid, sorbic acid, benzoic acid, butyric acid, and hexanoic acid) and nature identical compounds (thymol, vanillin, carvacrol, and eugenol) has been evaluated by a microdilution MIC test. All the nature identical compounds were effective in inhibiting bacterial growth and in particular thymol and carvacrol showed the lowest MIC compared to all the substances tested (1.87 mM). Among organic acids, sorbic acid, benzoic acid and hexanoic acid had a MIC of 100 mM. Thymol, carvacrol and sorbic acid were selected for a time-kill study, from which emerged the bactericidal action of the two nature identical compounds and the bacteriostatic action of sorbic acid. The results of this study indicate that these bioactive compounds can therefore be used as feed additives to control *Salmonella typhimurium* in pigs.

### INTRODUZIONE

*Salmonella typhimurium* è riportata come la seconda causa più comune in Europa tra i casi di infezioni gastrointestinali nell'uomo (EFSA, 2018). Tra questi casi, il 27.3% dei ceppi isolati nell'uomo è risultata associata a matrici di origine suina, confermando che questa specie animale rappresenta una delle principali vie di trasmissione all'uomo (Barilli et al., 2018; EFSA, 2018).

L'infezione da *S. typhimurium* nell'animale infatti non è da sottovalutare, in quanto il suino, essendo un ospite asintomatico, rappresenta un importante reservoir del patogeno. *S. typhimurium* colonizza in maniera persistente e cronica il tratto gastrointestinale del suino e, durante i periodi di stress, spesso si verifica una riacutizzazione di questa colonizzazione asintomatica (Verbrugghe et al., 2015). In primo luogo, il contesto più pericoloso per la riacutizzazione è il trasporto e l'arrivo al macello, dove la diffusione di questo patogeno è amplificata e diventa la principale via di trasmissione all'uomo (Verbrugghe et al., 2011; Grilli et al., 2015). Essendo quindi la catena alimentare il fattore di rischio maggiore per l'uomo, altrettanto critico risulta il fenomeno di antibiotico resistenza che caratterizza *S. typhimurium*. Numerosi sono i ceppi di *S. typhimurium* risultati multiresistenti agli antibiotici (Graziani et al., 2008; Brunelle et al., 2017; Wang et al., 2019) and the Centers for Disease Control consider multidrug-resistant (MDR. In particolare, un recente studio di Wang et al. (2019) ha identificato nel suino la principale fonte di due pattern di tetra e penta-resistenza più frequentemente osservati in ceppi di *S. typhimurium* isolati da uomo, animali e prodotti di origine animale. Di fondamentale importanza in questo scenario globale è quindi cercare di ricorrere ad alternative gli antibiotici per il controllo di *S. typhimurium* nel suino (Grilli et al., 2015; V. T. Nair et al., 2018). Scopo di questo studio è stato quello di identificare possibili composti bioattivi utilizzati come additivi per mangimi, quali acidi organici e composti naturali identici, per il controllo di *S. typhimurium* nel suino.

## MATERIALI E METODI

### *Composti testati*

Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico, acido esanoico, timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo rappresentano gli acidi organici e composti naturali identici oggetto dello studio. Gli stock degli acidi organici sono stati preparati in infuso cuore e cervello (BHI), mentre gli stock dei composti naturali identici in etanolo 70% v/v. Tutti gli stock sono stati portati a pH 6.5 e filtrati con filtri 0.2 µm.

### *MIC test*

Acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico sono stati testati in diluizioni scalari da 100 a 1.56 mM, mentre timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo da 7.5 a 0.12 mM. *S. typhimurium* ATCC® 6994™ è stata coltivata in BHI a 37°C in aerobiosi ed è stato utilizzato un inoculo di 10<sup>6</sup> CFU. Il valore di minima concentrazione inibente (MIC) di acidi organici e composti naturali identici è stato determinato con test di microdiluizione in BHI pH 6.5, attraverso la misurazione dell'assorbanza a 630 nm dopo 24 ore di incubazione con l'utilizzo di uno spettrofotometro. Per ogni sostanza, la MIC è stata definita come la concentrazione più bassa in grado di restituire un'assorbanza nulla dopo 24 ore di incubazione.

### *Time-kill test*

Dopo uno screening iniziale, acido sorbico, timolo e carvacrolo sono stati selezionati per un esperimento di time-kill, ossia una valutazione nell'arco di 24 ore della riduzione della conta batterica di un determinato ceppo coltivato in presenza di un agente antimicrobico. I saggi sono stati allestiti in BHI pH 6.5, testando acido sorbico ad una concentrazione di 50 e 100 mM, mentre timolo e carvacrolo ad una concentrazione di 0.94 e 1.87 mM. Dopodiché, al fine di valutare l'inibizione della crescita batterica da parte delle sostanze, sono state effettuate conte su piastre BHI agar dal momento dell'inoculo con 10<sup>6</sup> CFU di *S. typhimurium* (0 ore), ogni ora per le 8 ore successive e dopo 24 ore.

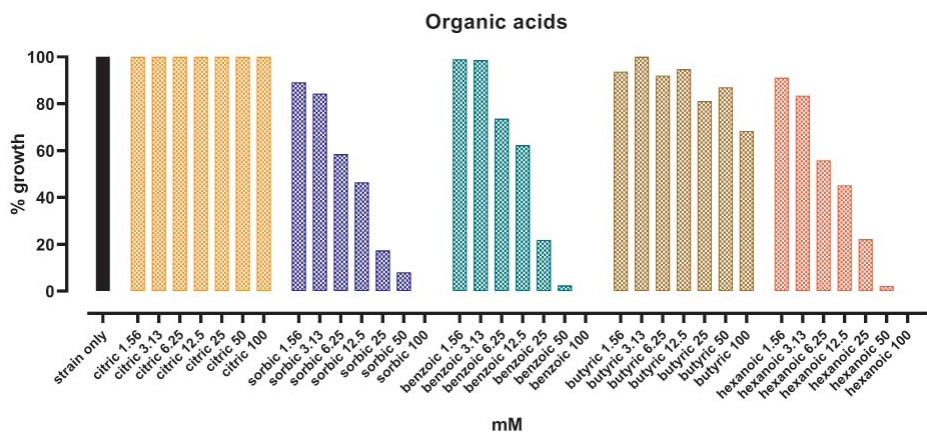
## RISULTATI

### *MIC test*

I risultati dell'attività antimicrobica di acidi organici e composti naturali identici sono riportati

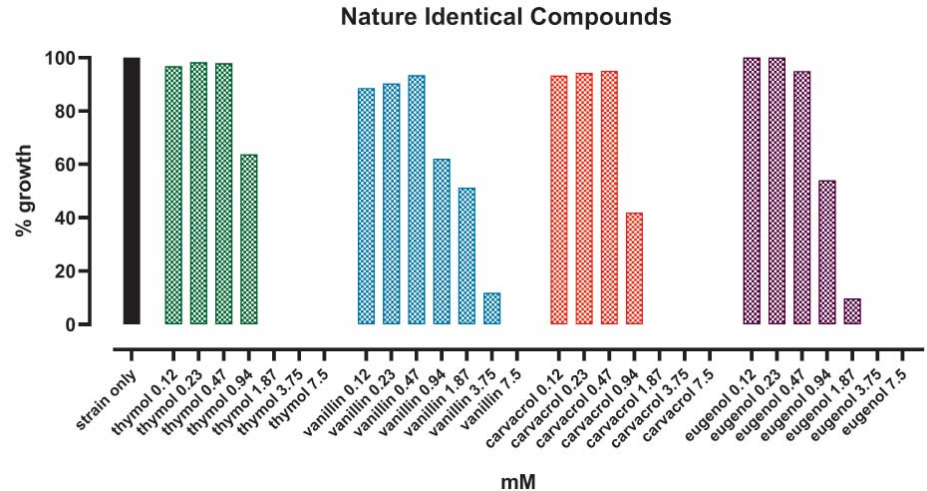


rispettivamente nelle Figure 1 e 2. Acido citrico e acido butirrico non hanno avuto alcun effetto inibitorio sul ceppo di *S. typhimurium* alle dosi testate. Al contrario, acido sorbico, benzoico ed esanoico hanno presentato una MIC corrispondente a 100 mM. Per quanto riguarda i composti naturali identici, la MIC di timolo e carvacrolo è stata definita a 1.87 mM, mentre per vanillina ed eugenolo la crescita batterica è stata completamente inibita rispettivamente a 7.5 mM e 3.75 mM.



**Figura 1** – Crescita di *S. typhimurium* dopo 24 ore in presenza di acido citrico, acido sorbico, acido benzoico, acido butirrico ed acido esanoico. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (strain only).

**Figure 1** - *S. typhimurium* growth after 24 hours in the presence of citric acid, sorbic acid, benzoic acid, butyric acid and hexanoic acid. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strain only).



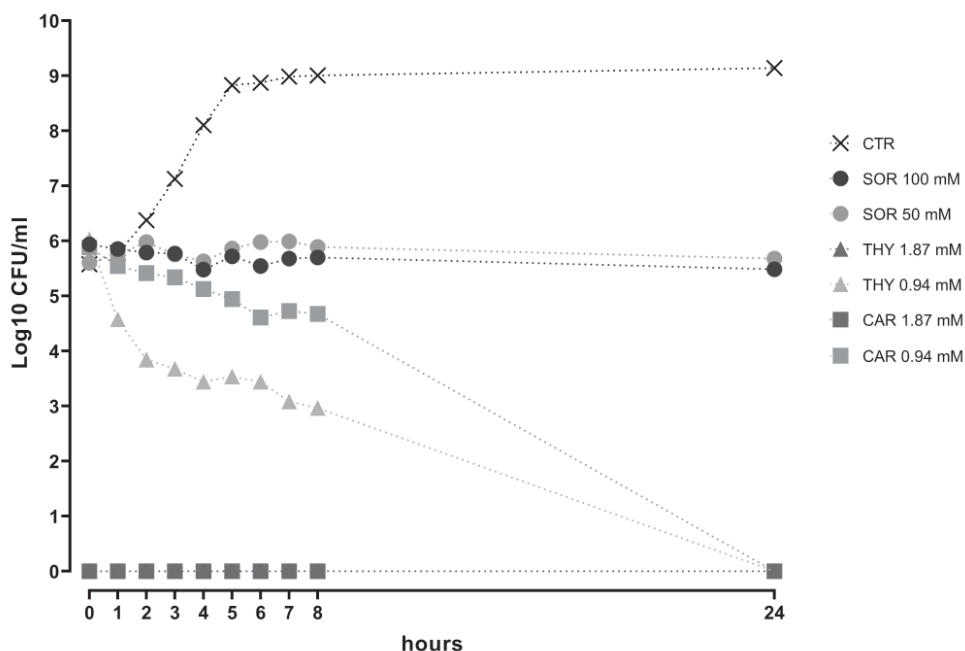
**Figura 2** – Crescita di *S. typhimurium* dopo 24 ore in presenza di timolo, vanillina, carvacrolo ed eugenolo. La crescita batterica è espressa in percentuale rispetto al controllo (strain only).

**Figure 2** - *S. typhimurium* growth after 24 hours in the presence of thymol, vanillin, carvacrol and eugenol. Bacterial growth is expressed as a percentage relative to the control (strain only).



### Studio time-kill

In Figura 3 sono rappresentate le curve del time-kill test. La concentrazione di *S. typhimurium* in presenza di acido sorbico 50 e 100 mM non è variata durante le 24 ore post-inoculazione. Al contrario, al termine dell'esperimento tutte le concentrazioni testate di timolo e carvacrolo sono risultate letali per la crescita di *S. typhimurium*. Timolo e carvacrolo 0.94 mM hanno consentito una graduale riduzione del numero di cellule vitali durante gli intervalli di tempo misurati, arrivando, come sopracitato, ad inibire completamente la crescita del patogeno a 24 ore. Le stesse sostanze alla concentrazione superiore (1.87 mM) hanno permesso la immediata soppressione della popolazione batterica inoculata al tempo 0.



**Figura 3** – Curve time-kill. Nel grafico è riportato il logaritmo in base 10 di CFU/ml di *S. typhimurium*, coltivata con nessuna sostanza (CTR) o in presenza di acido sorbico (SOR), timolo (THY) e carvacrolo (CAR) a diverse concentrazioni, in relazione agli intervalli di tempo misurati.

**Figure 3** - Time-kill curves. The graph shows the based-10 logarithm of *S. typhimurium* CFU/ml, grown without substances (CTR), or in presence of thymol (THY), carvacrol (CAR), and sorbic acid (SOR) at different concentrations, in relation to the measured time points.

### DISCUSSIONE

Nel presente studio è stata valutata l'azione antimicrobica di acidi organici e composti naturali identici nei confronti di *S. typhimurium* ATCC® 6994™.

In generale, mentre tutti i composti naturali identici sono stati efficaci nell'inibizione della crescita del ceppo batterico, tra gli acidi organici testati è stata determinata la MIC solamente di acido sorbico, acido benzoico ed acido esanoico. Ciò può essere giustificato dal meccanismo d'azione antimicrobico di queste diverse sostanze: infatti, mentre i composti naturali identici espletano la loro principale azione sulla membrana dei microorganismi portando alla formazione di pori che provocano la morte cellulare, l'azione antimicrobica degli acidi organici dipende dalla loro costante di dissociazione (pKa) (Ricke, 2003; Burt,

2004). Si deduce quindi che, al variare del pH ambientale, gli acidi organici possano presentarsi o meno nella loro forma indissociata, la quale rappresenta l'unica forma grazie a cui queste molecole riescono ad attraversare la membrana batterica. Avendo allestito l'esperimento a pH 6.5, è quindi possibile che l'azione antimicrobica di alcuni acidi organici non fosse completamente massimizzata. A riprova di ciò, acido sorbico, benzoico ed esanoico presentano infatti le pKa che più si avvicinano al pH dell'esperimento (4.76, 4.19, 5.09, rispettivamente). Sebbene abbia una pKa modestamente alta (4.82), l'acido butirrico non ha invece un effetto antimicrobico diretto sul batterio, ma è stato utilizzato *in vivo* nelle infezioni da *S. typhimurium*, grazie alla capacità di diminuire l'espressione di geni di patogenicità e di rinforzare l'apparato gastrointestinale dell'animale (Gantois et al., 2006). Oltre al pH, l'azione degli acidi organici varia comunque anche a seconda della struttura del batterio (Sheu and Freese, 1973).

Dopo aver selezionato tre sostanze esemplificative (timolo, carvacrolo ed acido sorbico), un ulteriore studio di time-kill è stato eseguito per mettere in luce gli effetti antimicrobici di queste molecole in un intervallo di tempo di 24 ore. La stessa tecnica è stata utilizzata in molti studi per descrivere l'azione di sostanze alternative, da sole ed in combinazione con antibiotici (Singh et al., 2011; Petsong et al., 2018; Guimarães et al., 2019). Dalle curve time-kill è stata evidenziata un'azione battericida dose-dipendente di timolo e carvacrolo ed un'azione batteriostatica dell'acido sorbico. Timolo e carvacrolo alle dosi più alte testate (1.87 mM) confermano i dati ottenuti dal MIC test, andando a sopprimere *S. typhimurium* non appena dopo l'inoculazione. A differenza del primo esperimento, nella curva time-kill le stesse sostanze anche a dose dimezzata (0.94 mM) hanno permesso di inibire completamente la crescita del ceppo dopo 24 ore: probabilmente questa variabilità, seppur minima, è dettata dalla diversità dei due sistemi. In ogni caso, l'efficacia di timolo e carvacrolo contro *S. typhimurium* in questo studio è affermata da numerosi studi (Juven et al., 1994; Zhou et al., 2007; Chauhan and Kang, 2014). Per quanto riguarda l'acido sorbico, le conte batteriche non sono variate nell'arco di 24 ore, indicando un'azione batteriostatica che riconferma la teoria sopracitata riguardo l'azione antimicrobica degli acidi organici. Da questo risultato si evidenzia come la molecola sia comunque in grado di arginare un'infezione da *S. typhimurium*.

## CONCLUSIONI

In conclusione, acidi organici e composti naturali identici possono essere potenziali sostanze alternative utilizzate per controllare *S. typhimurium* nel suino, in quanto la loro attività antimicrobica nei confronti di questo patogeno di origine alimentare è stata confermata dai risultati di questo studio.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barilli E., Bacci C., StellaVilla Z., Merialdi G., D'Incau M., Brindani F., Vismarra A. (2018) "Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in Salmonella isolated from pigs bred on intensive farms." Ital J Food Saf. 7, 7223.
2. Brunelle B.W., Bearson B.L., Bearson S.M.D., Casey T.A. (2017) "Multidrug-Resistant Salmonella enterica Serovar Typhimurium Isolates Are Resistant to Antibiotics That Influence Their Swimming and Swarming Motility". mSphere. 2.
3. Burt S. (2004) "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review". Int J Food Microbiol. 94, 223–253.
4. Chauhan A.K., Kang S.C. (2014) "Thymol disrupts the membrane integrity of Salmonella ser. typhimurium in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model". Res Microbiol. 165, 559–565.
5. EFSA (2018) "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017". EFSA Journal. 16, e05500.

6. Gantois I., Ducatelle R., Pasmans F., Haesebrouck F., Hautefort I., Thompson A., Hinton J.C., Immerseel F.V. (2006) "Butyrate Specifically Down-Regulates Salmonella Pathogenicity Island 1 Gene Expression". *Appl Environ Microbiol.* 72, 946–949.
7. Graziani C., Busani L., Dionisi A.M., Lucarelli C., Owczarek S., Ricci A., Mancin M., Caprioli A., Luzzi I. (2008) "Antimicrobial resistance in Salmonella enterica serovar Typhimurium from human and animal sources in Italy". *Vet Microbiol.* 128, 414–418.
8. Grilli E., Foresti F., Tugnoli B., Fustini M., Zanoni M.G., Pasquali P., Callaway T.R., Piva A., Alborali G.L. (2015) "Microencapsulated sorbic acid and pure botanicals affect Salmonella Typhimurium shedding in pigs: a close-up look from weaning to slaughter in controlled and field conditions". *Foodborne Pathog Dis.* 12, 813–819.
9. Guimarães A.C., Meireles L.M., Lemos M.F., Guimarães M.C.C., Endringer D.C., Fronza M., Scherer R. (2019) "Antibacterial Activity of Terpenes and Terpenoids Present in Essential Oils". *Molecules.* 24.
10. Juven B., Kanner J., Schved F., Weisslowicz H. (1994) "Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents". *J Appl Bacteriol.* 76, 626–631.
11. Petsong K., Uddin M.J., Vongkamjan K., Ahn J. (2018) "Combined effect of bacteriophage and antibiotic on the inhibition of the development of antibiotic resistance in Salmonella typhimurium". *Food Sci Biotechnol.* 27, 1239–1244.
12. Ricke S.C. (2003) "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials". *Poult Sci.* 82, 632–639.
13. Sheu C.W., Freese E. (1973) "Lipopolysaccharide layer protection of gram-negative bacteria against inhibition by long-chain fatty acids". *J Bacteriol.* 115, 869–875.
14. Singh A.P., Preet S., Rishi P. (2011) "Augmentation of antimicrobial activity of conventional antibiotics by cell-free extract of *L. plantarum*". *J Antibiot.* 64, 795–798.
15. V. T. Nair D., Venkitanarayanan K., Kollanoor Johny A. (2018) "Antibiotic-Resistant Salmonella in the Food Supply and the Potential Role of Antibiotic Alternatives for Control". *Foods.* 7.
16. Verbrugghe E., Boyen F., Van Parys A., Van Deun K., Croubels S., Thompson A., Shearer N., Leyman B., Haesebrouck F., Pasmans F. (2011) "Stress induced Salmonella Typhimurium recrudescence in pigs coincides with cortisol induced increased intracellular proliferation in macrophages". *Vet Res.* 42, 118.
17. Verbrugghe E., Van Parys A., Leyman B., Boyen F., Haesebrouck F., Pasmans F. (2015) "HtpG contributes to Salmonella Typhimurium intestinal persistence in pigs". *Vet Res.* 46, 118.
18. Wang X., Biswas S., Paudyal N., Pan H., Li X., Fang W., Yue M. (2019) "Antibiotic Resistance in Salmonella Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016". *Front Microbiol.* 10.
19. Zhou F., Ji B., Zhang H., Jiang H., Yang Z., Li J., Li J., Yan W. (2007) "The Antibacterial Effect of Cinnamaldehyde, Thymol, Carvacrol and Their Combinations Against the Foodborne Pathogen Salmonella Typhimurium". *J Food Saf.* 27, 124–133.

# CONSUMO DI ANTIMICROBICI E PERFORMANCE PRODUTTIVE IN SCROFE E SUINETTI IN SALA PARTO

## RELATIONSHIP BETWEEN ANTIMICROBIAL USE (AMU) AND PRODUCTION IN SOWS AND PIGLETS IN THE FARROWING UNIT

GIUDICI F.<sup>1</sup>, SCALI F.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, MAISANO A. M.<sup>1</sup>, GUADAGNO F.<sup>1</sup>, TONNI M.<sup>1</sup>,  
FORESTI F.<sup>2</sup>, GIACOMINI E.<sup>2</sup>, GUADAGNINI G.<sup>3</sup>, SCOLLO A.<sup>3</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna

<sup>2</sup>Allevamenti di Nerviano srl; <sup>3</sup>Veterinario libero professionista

**Parole chiave:** suini, CIA, parametri produttivi

**Keywords:** pigs, critically important antimicrobials, productive performances

### RIASSUNTO

L'uso razionale degli antimicrobici nella produzione suinicola, in particolare degli 'highest priority critically important antimicrobials' (HPCIA), è fondamentale per combattere l'antimicrobico resistenza. Lo scopo dello studio è stato indagare possibili relazioni tra consumo di antimicrobici e performance produttive in scrofe e suinetti sottoscrofa. Il campionamento ha interessato i dati 2016 di 43 allevamenti. Il consumo di antimicrobici è stato espresso come Treatment Incidence 100 (TI<sub>100</sub>) utilizzando, come unità di misura standard, le *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit). I dati produttivi raccolti sono stati: portata al parto, parti/scrofa/anno, mortalità sottoscrofa, nati vivi e svezzati/scrofa/anno. I sottoscrofa sono risultati più esposti agli antimicrobici (mediana TI<sub>100</sub>=42,5) delle scrofe (mediana TI<sub>100</sub>=2,6). Gli HPCIA hanno rappresentato il 16,7% del consumo totale nelle scrofe ed il 48,9 % nei sottoscrofa. Nelle scrofe si è ricorso principalmente a somministrazioni di massa (38,5% prodotti orali, 55,4% premix), mentre nei sottoscrofa a quelle individuali (72,1% iniettabili). Nessuna correlazione è emersa tra consumo di antimicrobici e parametri produttivi. I risultati di questo studio devono essere interpretati con cautela, visto il campione limitato. Tuttavia, sia l'assenza di correlazioni tra consumo e parametri produttivi sia l'uso frequente di HPCIA suggeriscono l'importanza di migliorare i programmi razionalizzazione degli antimicrobici.

### ABSTRACT

Rational antimicrobial use (AMU) in pig production, especially of WHO's highest priority critically important antimicrobials (HPCIA), is pivotal in order to slow-down the spread of antimicrobial resistance. Aim of this work was to investigate AMU patterns in farrowing sector and possible relationships between AMU and productive performances. Data of 2016 in 43 herds were collected during farm visits. The AMU was expressed as Treatment Incidence 100 (TI<sub>100</sub>) using Defined Daily Dose Animal for Italy (DDDAit) as standard unit of measurements. Productive performances were also collected such as pregnancy rate, litters by sow per year, preweaning mortality, number of piglets born and weaned by sow per year. Piglets were more exposed to antimicrobials (median TI<sub>100</sub>=42.5) than sows (median TI<sub>100</sub>=2.6). HPCIA represented 16.7% of overall AMU in sows and 48.9% in piglets. In both categories, penicillins was the most used class. Group treatments (38.5% oral powders or solutions, 55.4% premixes) were the most common in sows, whereas individual treatments (72.1% injectables) were most frequent in piglets. No significant correlation between AMU patterns and production performances were found. Considering

the limited sample, results of this study should be interpreted with caution. Nevertheless, both the absence of correlation between AMU and production and the frequent use of HPClAs suggested the importance of improving antimicrobial stewardship programs in those farms.

## INTRODUZIONE

L'antibiotico resistenza (AMR) è un fenomeno naturale che può essere drammaticamente esacerbato dall'impiego irrazionale degli antimicrobici che induce una forte pressione selettiva sui batteri. L'insorgenza e la diffusione dell'AMR nell'uomo e negli animali sono strettamente interconnesse, in particolare per quanto riguarda l'allevamento degli animali da reddito (Woolhouse et al., 2015). Pertanto, l'adozione di politiche atte alla riduzione ed alla razionalizzazione del consumo di antimicrobici, per quanto complesse, sono vitali per il contrasto dell'AMR (Woolhouse et al., 2015). L'Italia è sia uno dei principali consumatori di antimicrobici nell'Area Economica Europea (EMA, 2018), sia uno Stato con un rilevante sviluppo del settore agro-zootecnico. Sebbene negli ultimi dieci anni l'allevamento del suino abbia vissuto un'importante contrazione, esso rappresenta tutt'oggi, con oltre 11 milioni di suini macellati l'anno, un'importante componente della zootecnia italiana, così come una preoccupante potenziale fonte di AMR che non può essere sottovalutata.

La sorveglianza sull'uso dei medicinali veterinari in generale, e degli antimicrobici in particolare, rappresenta una delle precauzioni principali nel quadro delle azioni atte a valutarne l'impatto e l'efficacia e a contenere lo sviluppo e la diffusione dell'antimicrobico-resistenza. L'utilizzo di misure standardizzate di calcolo ha l'obiettivo di migliorare l'esattezza della stima dell'esposizione dell'animale agli antimicrobici.

Scopo di questo lavoro è quello di indagare possibili relazioni tra i consumi di antimicrobici ed i principali indici produttivi, ponendo particolare attenzione ai consumi di antimicrobici critici, da preservare per la medicina umana e non solo animale.

## MATERIALI E METODI

### Campione

Nello studio sono state incluse 43 aziende da riproduzione che hanno partecipato allo studio e validazione del sistema ClassyFarm ([www.classyfarm.it](http://www.classyfarm.it)). Ai fini del presente lavoro, sono stati considerati unicamente consumi e dati zootecnici/produttivi 2016 riferibili a scrofe e suinetti sottoscrofa. I dati sono stati raccolti retrospettivamente durante visite aziendali effettuate tra gennaio e settembre 2017. I dati grezzi, per quanto riguarda gli antimicrobici, sono stati raccolti da fonti cartacee (registri e ricette). I dati zootecnici e produttivi, forniti dall'allevatore, sono stati: presenza media scrofe, numero parti per scrofa per anno, portata al parto, numero di suinetti nati vivi nell'anno, mortalità nei sottoscrofa, nati vivi per scrofa per anno, svezzati per scrofa per anno.

### Consumo antimicrobici

Il consumo degli antimicrobici è stato stimato separatamente per scrofe e suinetti sottoscrofa, secondo due diversi standard, entrambi basati sulle *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit): le DDD/capo ed il *Treatment Incidence* 100 (TI<sub>100</sub>).

Le DDD/capo sono state calcolate secondo la seguente formula:

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

Dove:

- DDDAit = la dose in milligrammi di principio attivo utilizzata per tenere sotto trattamento un chilogrammo di peso nell'arco di ventiquattro ore, secondo quanto definito dal riassunto delle caratteristiche del prodotto (RCP).
- Animali = presenza media di scrofe nel 2016 oppure, per i sottoscrofa, nati vivi nel 2016
- Peso standard = 240 kg per le scrofe e 4 kg per i sottoscrofa.

Il  $TI_{100}$  è invece secondo la seguente formula (AACTING, 2019):

$$\sum_{i=1}^n \frac{\text{Principio Attivo}_i \text{ consumato (mg)}}{\text{DDDAit}_i \text{ (mg/kg PV DIE)} \times \text{animali (n)} \times \text{peso standard (kg)} \times \text{durata ciclo (giorni)}} \times 100$$

Dove:

- Durata ciclo = 365 per le scrofe e 25 giorni per i sottoscrofa.

### Principi attivi critici

Allo stato attuale non sono disponibili indicazioni univoche per la classificazione delle molecole “critiche” tra le linee guida delle diverse agenzie nazionali/internazionali. Per il presente studio si è deciso di adottare la classificazione OMS che indica le classi di *‘highest priority critically important antimicrobials’* (HPCIA) per la medicina umana. Nella fattispecie: cefalosporine di III e IV generazione, fluorchinoloni, polimixine, chinoloni e macrolidi (WHO, 2019).

### Analisi statistica

Le informazioni riguardanti i consumi di antimicrobici sono state inserite e processate attraverso il sistema di monitoraggio integrato ClassyFarm. Tali dati sono inoltre stati esportati dal database ClassyFarm per ulteriori analisi. Microsoft Excel (Microsoft Corporation. Redmond, WA, USA) è stato utilizzato per la gestione dei dati così esportati. Le relazioni tra i consumi di antimicrobici ed i parametri produttivi sono state indagate con il test di correlazione a ranghi di Spearman. Tutte le analisi statistiche sono state svolte utilizzando GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

## RISULTATI

Il campionamento ha riguardato il consumo di antimicrobici e i dati zootecnici di 43 allevamenti per un totale di 37.322 scrofe (mediana 580; range 180 – 3.354) e 1.019.422 di suinetti nati vivi (mediana 17.701; range 4791 – 94.655) durante il 2016. In Tabella 1 sono riepilogati i dati zootecnici dei principali parametri produttivi.

**Tab. 1** – Parametri produttivi (mediana e range) in 43 aziende suinicole italiane

**Tab. 1** – Production data (median and range) of the farrowing sector in 43 Italian pig farms

| Parametro                 | Mediana (Range)           |
|---------------------------|---------------------------|
| Scrofe                    | <b>580</b> (180-3354)     |
| Nati Vivi 2016            | <b>17701</b> (4791-94655) |
| Mortalità Sottoscrofa (%) | <b>10,9</b> (1,3-19,7)    |
| Nati Vivi /Scrofa /Anno   | <b>27,05</b> (19,8-34,8)  |
| Parti/ Scrofa/Anno        | <b>2,2</b> (1,9-2,5)      |
| Svezziati/ Scrofa/anno    | <b>24</b> (17,1-29,3)     |
| Portata al Parto          | <b>80,2</b> (64-92)       |

Dall’analisi dei consumi degli antimicrobici, i suinetti sottoscrofa sono risultati molto più esposti rispetto alle scrofe. Prendendo in considerazione il consumo di HPCIA nelle scrofe e nei sottoscrofa, è evidente un utilizzo maggiore nei sottoscrofa rispetto alle scrofe (Tabella 2).

**Tab. 2** – Mediana e range di consumo antimicrobici (totale e HPCIA), espresso come DDDAit e TI<sub>100</sub>, per scrofe e suinetti sottoscrofa in 43 aziende suinicole italiane

**Tab. 2** – Median and ranges of AMU (overall and HPCIA), expressed as DDDAit/pig and TI<sub>100</sub>, in the farrowing sector of 43 Italian pig farms

| Categoria animale | Consumo Totale Antimicrobici |                   | Consumo Antimicrobici HPCIA |                   |
|-------------------|------------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|
|                   | DDDAit                       | TI <sub>100</sub> | DDDAit                      | TI <sub>100</sub> |
| Scrofe            | 9,49 (0-146,69)              | 2,60 (0-40,19)    | 2,19 (0-55,41)              | 0,6 (0-15,18)     |
| Sottoscrofa       | 10,64 (0-39,74)              | 42,54 (0-158,97)  | 6,16 (0-30,70)              | 24,63 (0-122,81)  |

Come evidenziato in Fig. 1, nelle scrofe l’utilizzo di antimicrobici HPCIA rappresentano il 17% del consumo totale mentre nei sottoscrofa il 49%.

**Fig. 1** – Distribuzione del consumo di antimicrobici (HPCIA e non) in scrofe e sottoscrofa di 43 aziende suinicole italiane

**Fig. 1** – Distribution of antimicrobial use (HPCIA and not HPCIA) in the farrowing sector of 43 Italian pig farms



La classe di antimicrobici più somministrata è stata quella delle penicilline per entrambe le categorie; tali antimicrobici hanno rappresentato il 27,2% degli interi consumi nelle scrofe ed il 46,6% nei suinetti. La media ponderata delle DDDAit delle aziende campionate è risultata pari a 30,35 nelle scrofe e 17,26 nei sottoscrofa ed il TI<sub>100</sub> pari a 8,31 nelle scrofe e 69,05 nei suinetti sottoscrofa (Tabella 3).



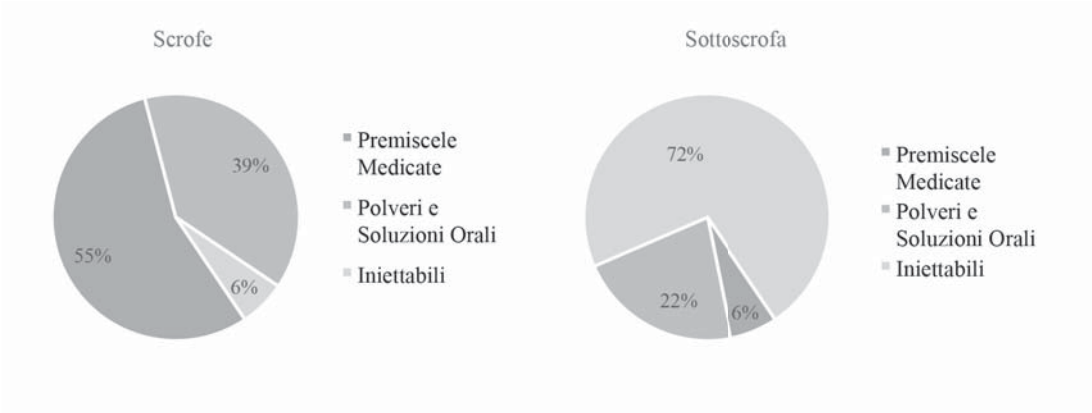
**Tab. 3** – Consumi espressi in DDDAit e TI<sub>100</sub> per classe di antimicrobici espresso come mediana (range) di DDDAit e TI<sub>100</sub> e percentuale del consumo totale per ogni classe di antimicrobici

**Tab. 3** – Antimicrobial consumption, for each antimicrobial class, expressed as median DDDAit and TI<sub>100</sub> and percentage of total consumption for critical antimicrobial classes.

| Classe                           | Consumo Scrofe |                  |            | Consumo Sottoscrofa |                  |            |
|----------------------------------|----------------|------------------|------------|---------------------|------------------|------------|
|                                  | DDDAit         | T <sub>100</sub> | %          | DDDAit              | T <sub>100</sub> | %          |
| Penicilline                      | 8,26           | 2,26             | 27,20      | 8,05                | 32,21            | 46,65      |
| Tetraciclina                     | 7,97           | 2,18             | 26,27      | 0,09                | 0,36             | 0,52       |
| Ampenicoli                       | 0,07           | 0,02             | 0,23       | 0,07                | 0,27             | 0,39       |
| Aminoglicosidi                   | 0,29           | 0,08             | 0,97       | 0,54                | 2,14             | 3,1        |
| Lincosamidi                      | 6,33           | 1,73             | 20,86      | 0,01                | 0,03             | 0,05       |
| Sulfamidici (incl. trimethoprim) | 1,09           | 0,30             | 3,58       | 0,06                | 0,23             | 0,34       |
| Pleuromutiline                   | 1,27           | 0,35             | 4,19       | 0                   | 0,00             | 0          |
| Cefalosporine di III e IV gen.   | 0,05           | 0,01             | 0,17       | 4,21                | 16,82            | 24,36      |
| Polimixine                       | 0,12           | 0,03             | 0,39       | 0,78                | 3,12             | 4,52       |
| Fluorochinoloni                  | 0,56           | 0,15             | 1,84       | 0,66                | 2,64             | 3,83       |
| Altri chinoloni                  | 3,96           | 1,08             | 13,03      | 0                   | 0,00             | 0          |
| Macrolidi                        | 0,38           | 0,11             | 1,26       | 2,8                 | 11,21            | 16,23      |
| <b>Totale</b>                    | <b>30,35</b>   | <b>8,32</b>      | <b>100</b> | <b>17,26</b>        | <b>69,05</b>     | <b>100</b> |

Nelle scrofe hanno prevalso le somministrazioni di massa mentre nei sottoscrofa quelle individuali (Figura 2)

**Fig. 2** – Tipologia di somministrazione – Scrofe e Sottoscrofa  
**Fig. 2** – Use, by type of medicinal, in sows and sucking piglets

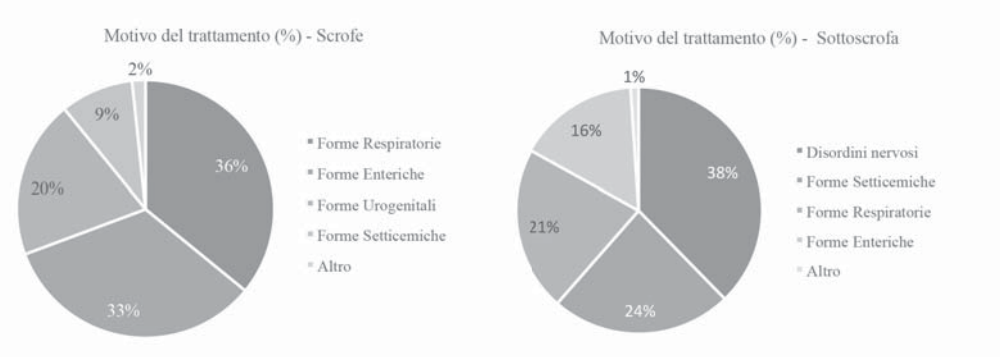


Nelle scrofe i trattamenti sono motivati soprattutto da forme respiratorie, enteriche e urogenitali, mentre nei suinetti sottoscrofa da forme nervose, setticemiche e respiratorie (Tabella 4).

**Tab. 4** – Consumi di antimicrobici per scrofe e sottoscrofa suddivisi secondo il motivo del trattamento  
**Tab. 4** – Antimicrobial consumption for sows and piglets divided for pathology

| Motivo del trattamento | Consumo Scrofe |                  |            | Consumo Sottoscrofa |                  |            |
|------------------------|----------------|------------------|------------|---------------------|------------------|------------|
|                        | DDDAit         | T <sub>100</sub> | %          | DDDAit              | T <sub>100</sub> | %          |
| Forme Enteriche        | 10,15          | 2,78             | 33,4       | 2,74                | 10,97            | 15,89      |
| Forme Respiratorie     | 10,90          | 2,99             | 35,9       | 3,74                | 14,94            | 21,63      |
| Forme Setticemiche     | 2,77           | 0,76             | 9,18       | 4,10                | 16,39            | 23,73      |
| Disordini nervosi      | 0              | 0,00             | 0          | 6,51                | 26,04            | 37,71      |
| Forme Locomotorie      | 0,36           | 0,1              | 1,22       | 0,07                | 0,27             | 0,39       |
| Forme Urogenitali      | 6,02           | 1,65             | 19,83      | 0                   | 0,00             | 0          |
| Forme Dermatologiche   | 0              | 0,00             | 0          | 0,11                | 0,43             | 0,63       |
| Altro                  | 0,15           | 0,04             | 0,46       | 0                   | 0,01             | 0,02       |
| <b>Totale</b>          | <b>30,35</b>   | <b>8,32</b>      | <b>100</b> | <b>17,26</b>        | <b>69,05</b>     | <b>100</b> |

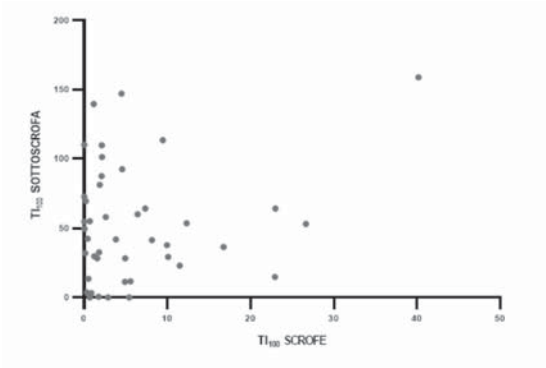
**Fig. 3** – Motivo del trattamento: Scrofe e Sottoscrofa  
**Fig. 3** – Pathologies: sows and piglets



In Figura 4 è illustrato il rapporto, non significativo, tra consumo di antimicrobici nelle scrofe e nei sottoscrofa.

**Fig. 4** – Grafico a dispersione che raffigura il rapporto tra i consumi di antimicrobici in scrofe e sottoscrofa, la correlazione non è risultata significativa (p = 0,894)

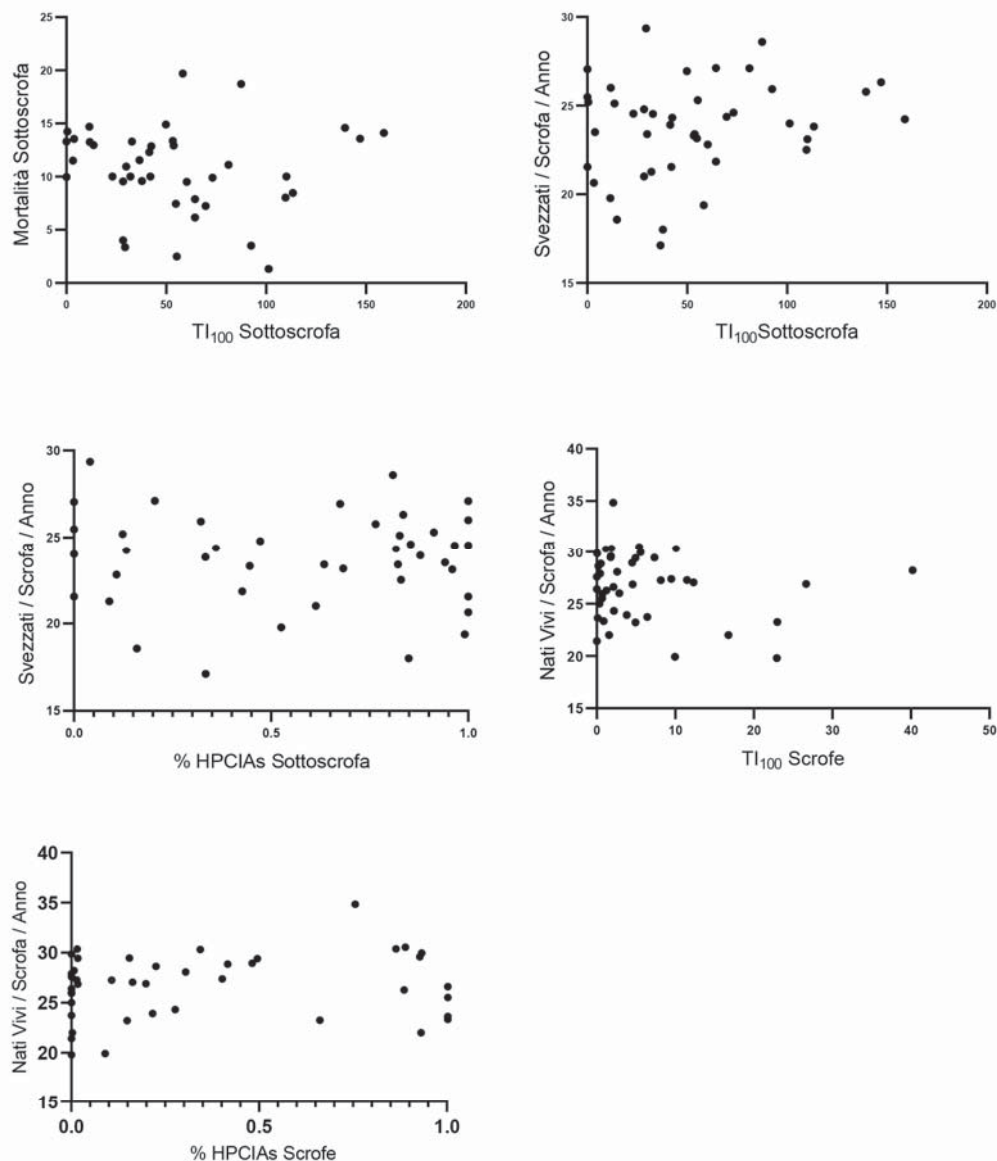
**Fig. 4** – Scatter plot of AMU in sows and sucking piglets, no significant correlation was found (p = 0.894).



Per quanto riguarda il rapporto tra consumo di antimicrobici e indici produttivi, non sono state riscontrate correlazioni significative, eccezion fatta per una debole correlazione positiva tra il numero totale di nati vivi ed il consumo di antimicrobici nei sottoscrofa ( $p$  di Spearman = 0,31;  $p = 0,047$ ). Ciascun puntino oggetto della serie rappresenta un allevamento. (Figura 5).

**Fig. 5** – Grafico a dispersione che raffigura rapporti tra i consumi di antimicrobici, per scrofe e sottoscrofa, e gli indici produttivi, nessuna correlazione è risultata significativa.

**Fig. 5** – Scatter plots showing of AMU and production parameters, no significant correlations were found



## DISCUSSIONE

Le DDD/capo rappresentano i giorni standard di trattamento a cui ciascuna categoria animale, allevata in azienda, è potenzialmente esposta durante il suo ciclo produttivo, tuttavia, la durata di tali cicli può variare anche in maniera notevole tra differenti categorie, come nel caso delle scrofe e dei suinetti sottoscrofa. Dunque, un determinato valore di DDD/capo (e quindi giorni di trattamento) potrebbe implicare dei rischi differenti, dal punto di vista dell'AMR, a seconda che si tratti di animali con cicli pluriennali come le scrofe, oppure, di categorie con cicli molto brevi (21 – 28 giorni) come i suinetti sottoscrofa. L'adozione di un indicatore come il  $TI_{100}$  permette di ovviare a questa limitazione poiché tiene conto anche della durata (standard) del ciclo produttivo. Tale indicatore può essere interpretato in tre modi (AACTING, 2019): 1) la percentuale che un animale passa potenzialmente sotto trattamento durante il suo intero ciclo produttivo; 2) il numero di giorni di trattamento ogni 100 giorni di ciclo; 3) il numero di animali sempre sotto trattamento ogni 100 allevati. Il  $TI_{100}$ , pertanto, può rappresentare un'importante evoluzione delle DDD/capo, soprattutto qualora si vogliano confrontare categorie o specie animali differenti. Infine, è importante ricordare che sia le DDD/capo che il  $TI_{100}$  considerano degli standard per il calcolo del consumo di antimicrobici (es. dosaggio, peso al trattamento), tali indicatori quindi non esprimono il consumo reale bensì una misura del rischio dei suini di essere esposti agli antimicrobici.

Il numero ridotto di aziende campionate ha rappresentato un limite dello studio considerando che, secondo il database di EUROSTAT (<https://ec.europa.eu/eurostat/data/database>), in Italia erano presenti circa 590.000 riproduttori nel 2016. Inoltre, i dati si riferiscono al 2016, periodo in cui le campagne di sensibilizzazione sull'uso razionale degli antimicrobici erano ancora agli inizi, in particolare per quanto riguarda i principi attivi "critici".

Una rilevante difficoltà incontrata durante la raccolta e l'elaborazione dei dati ha riguardato il calcolo dei consumi a livello aziendale. Tale procedimento, infatti, ha richiesto non soltanto l'analisi dei medicinali veterinari utilizzati (che presentano differenze di dosaggio e di durata del trattamento) ma anche degli "animali a rischio", che possono essere esposti a tali medicinali (numero e peso).

La precisione e l'accuratezza dei dati produttivi hanno rappresentato un altro limite dello studio sebbene le medie riscontrate siano risultate in linea con quelle nazionali (AHDB, 2017). Ad esempio, gli svezzati per scrofa per anno sono stati pari a 24,0 contro un valore nazionale di 24,3 (AHDB, 2017). Le ampie variazioni tra le aziende migliori e peggiori, sebbene potenzialmente dovute a numerosi fattori diversi dal consumo di antimicrobici (genetica, biosicurezza, management, ecc.), sono da interpretare con cautela poiché i dati sono stati forniti direttamente dagli allevatori e non è stato possibile validarli tramite fonti terze.

I risultati di questo lavoro mostrano, inoltre, che l'esposizione agli antimicrobici dei sottoscrofa è stata decisamente più elevata rispetto alle scrofe. Ciò può trovare giustificazione anche nel fatto che la fase di pre-svezzamento rappresenta un periodo del ciclo produttivo molto critico. È tuttavia importante sottolineare che il  $TI_{100}$  mediano sia calcolato su 365 giorni per le scrofe e su 25 giorni per i sottoscrofa. Inoltre, in taluni casi il  $TI_{100}$  dei sottoscrofa ha superato il valore di 100. Tale risultato può essere spiegato sia dall'utilizzo di molecole "long-acting" poco prima dello svezzamento, sia dalla somministrazione di più principi attivi contemporaneamente.

La classe di antimicrobici più somministrata per entrambe le categorie è stata quella delle penicilline. Analizzando i consumi per classe di antimicrobici utilizzati, nelle scrofe emerge un elevato utilizzo di penicilline e tetracicline; mentre nei sottoscrofa si evidenzia un utilizzo elevato di Cefalosporine di terza e quarta generazione. Questo dato desta particolare preoccupazione poiché risulta poco probabile che tali antimicrobici fossero gli

unici efficaci nei suinetti sottoscrofa delle aziende esaminate. Pertanto, i risultati dello studio fanno presupporre che non vi sia stato sempre un uso razionale del farmaco. Il consumo di antimicrobici è risultato estremamente variabile da azienda ad azienda, tale distribuzione è compatibile con quanto descritto in letteratura da altri studi sul suino leggero (Callens et al. 2012, Sarrazin, S., et al., 2018, Sjölund, M. et al., 2015, Sjölund, M. et al., 2016). I consumi di HPCIA nei sottoscrofa ricoprono quasi la metà delle somministrazioni di antimicrobici e le categorie principalmente utilizzate sono state cefalosporine di III e IV generazione e macrolidi. Per quanto riguarda i macrolidi, tuttavia, non vi è completo accordo tra le principali agenzie internazionali, infatti, l'OMS, li considera al massimo livello di criticità mentre la commissione di esperti nominata *ad hoc* dall'EMA (AMEG) propone di classificarli ad un livello d'importanza inferiore rispetto agli altri HPCIA (EMA, 2019) nella categoria C rendendoli di priorità inferiore rispetto alle cefalosporine (generazioni III e IV), polimixine e chinoloni che rientrano nella categoria B (EMA, 2019).

Nelle scrofe i trattamenti sono stati motivati soprattutto da forme respiratorie, enteriche ed urogenitali, mentre nei suinetti sottoscrofa da disordini nervosi, forme setticemiche e forme respiratorie. Sebbene queste frequenze di distribuzione possano risultare biologicamente plausibili è opportuno ricordare che le fonti dei dati del presente studio erano cartacee e che il lavoro è stato svolto in maniera retrospettiva. Pertanto, non è stato possibile verificare se i motivi del trattamento siano realmente dovuti alla patologia descritta o per scopo metafilattico o profilattico.

La mancanza di correlazione tra i consumi di queste due categorie di animali a rischio nelle aziende esaminate, così come le vistose differenze nei pattern di consumo (classi e vie di somministrazione), suggeriscono che scrofe e suinetti sottoscrofa siano sottopopolazioni completamente diverse per quanto riguarda l'uso del farmaco.

Le correlazioni tra i consumi di antimicrobici (totale e critici) ed i parametri produttivi per le aziende campionate non sono risultate significative. Tale risultato, sebbene potenzialmente viziato dai limiti campionari di qualità del dato, suggerisce che le performance produttive possano essere maggiormente influenzate da altri fattori. Inoltre, è comunque possibile ridurre il consumo di antimicrobici senza inficiare la produzione (Postma et al., 2017). Non sono emerse relazioni nemmeno tra le dimensioni aziendali, intese come numero di scrofe e suinetti sottoscrofa, ed il consumo di farmaco: pertanto, non è stata riscontrata una particolare attenzione al consumo di antimicrobici nelle aziende di grandi dimensioni rispetto a quelle più piccole (o viceversa).

L'unica correlazione significativa è emersa tra il numero di nati vivi per scrofa (per anno) ed il consumo totale di antimicrobici. Tuttavia, considerando i limiti campionari, i limiti del metodo statistico in sé (una correlazione non implica causalità) e la mancanza di plausibilità biologica si propende per interpretare tale risultato come una correlazione spuria. Di diversa rilevanza sarebbe stato, per esempio, un rapporto significativo tra consumo nei sottoscrofa ed il numero di svezzati per scrofa e/o dalla presenza di relazioni tra nati vivi per scrofa e l'uso di antimicrobici nelle scrofe.

## CONCLUSIONI

Dai risultati ottenuti è interessante osservare la mancanza di relazioni tra il consumo di antimicrobici e le performance produttive. Tale assenza suggerisce che le performance produttive possano essere influenzate da altri fattori più importanti o che, quantomeno, si possano raggiungere buoni risultati produttivi anche senza un impiego massivo di antimicrobici.

Il consumo di antimicrobici rilevato suggerisce che vi sia un'esposizione agli antimicrobici molto elevata nei suinetti sottoscrofa rispetto alle scrofe. È inoltre emerso nei suinetti

sottoscrofa un preoccupante consumo di Cefalosporine di terza e quarta generazione. È importante ricordare che le scrofe ed i sottoscrofa, per quanto riguarda il consumo di antimicrobici, siano risultate completamente differenti che potrebbero necessitare di un approccio alla razionalizzazione dell'uso di antimicrobici differente. Pertanto, sarebbe opportuno promuovere nelle scrofe trattamenti individuali tramite medicinali iniettabili rispetto ai trattamenti di massa somministrati per OS mentre, nei suinetti sottoscrofa, incoraggiare il ricorso all'uso degli antimicrobici solo in caso di reale necessità e con l'ausilio di un adeguato piano sanitario per cui è indispensabile la conoscenza della situazione epidemiologica aziendale ed utilizzo di antibiogrammi.

L'utilizzo degli antimicrobici non deve essere, infatti, mai né sistematico né applicato per compensare a livelli di igiene scarsa o a pratiche di allevamento inadeguate. La somministrazione di questi farmaci deve essere basata sulla diagnosi di malattia batterica, scegliendo la molecola nel modo più mirato possibile attraverso l'esecuzione di test di sensibilità per l'agente batterico causa di malattia e prediligendo molecole di prima ed in seguito di seconda scelta rispetto a quelle di ultima scelta, da preservare per la medicina umana, come indicato anche nelle linee guida ministeriali. È possibile inoltre limitare al minimo l'insorgenza di malattie adottando pratiche di gestione che riducano al minimo l'esposizione ai patogeni e allo stress, attraverso la definizione di un programma sanitario che comprenda trattamenti di prevenzione quali le vaccinazioni ed aumentando i livelli di biosicurezza e benessere.

## BIBLIOGRAFIA

1. AACTING, 2019. Guidelines for collection, analysis and reporting of farm-level antimicrobial use, in the scope of antimicrobial stewardship (version 1.2) Disponibile su: [https://aacting.org/swfiles/files/AACTING\\_Guidelines\\_V1.2\\_2019.07.02\\_54.pdf](https://aacting.org/swfiles/files/AACTING_Guidelines_V1.2_2019.07.02_54.pdf)
2. Agriculture and Horticulture Development Board (AHDB), 2017. Pig cost of production in selected countries. Disponibile su <https://projectblue.blob.core.windows.net/media/Default/Pork/Documents/Cost%20of%20Pig%20Production%202017-1.pdf>
3. Callens, B., Persoons, D., Maes, D., Laanen, M., Postma, M., Boyen, F., Haesebrouck, F., Butaye, P., Boudewijn, C. & Dewulf, J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive veterinary medicine*, 106(1), 53-62
4. European Medicines Agency (EMA) (2019). Categorisation of antibiotics in the European Union.. Disponibile su [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf)
5. European Medicines Agency (EMA) (2018). Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016. Disponibile su: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2016-trends-2010-2016-eighth-esvac\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-30-european-countries-2016-trends-2010-2016-eighth-esvac_en.pdf)
6. Postma, M., Vanderhaeghen, W., Sarrazin, S., Maes, D., & Dewulf, J. (2017). Reducing antimicrobial usage in pig production without jeopardizing production parameters. *Zoonoses and public health*, 64(1), 63-74.
7. Sarrazin, S., Joosten, P., Van Gompel, L., Luiken, R. E., Mevius, D. J., Wagenaar, J. A., Heederik J D., & Dewulf, J. (2018). Quantitative and qualitative analysis of antimicrobial usage patterns in 180 selected farrow-to-finish pig farms from nine European countries based on single batch and purchase data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(3), 807-816.
8. Sjölund, M., Backhans, A., Greko, C., Emanuelson, U., & Lindberg, A. (2015).

- Antimicrobial usage in 60 Swedish farrow-to-finish pig herds. *Preventive veterinary medicine*, 121(3-4), 257-264.
9. Sjölund, M., Postma, M., Collineau, L., Lösken, S., Backhans, A., Belloc, C., Emanuelson, U., E. GroßeBeilage, K. Stärk & Dewulf, J. (2016). Quantitative and qualitative antimicrobial usage patterns in farrow-to-finish pig herds in Belgium, France, Germany and Sweden. *Preventive veterinary medicine*, 130, 41-50.
  10. Woolhouse, M., Ward, M., van Bunnik, B., & Farrar, J. (2015). Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670):20140083
  11. World Health Organization. (2019): Critically important antimicrobials for human medicine: ranking of antimicrobial agents for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. 6th revision, Geneva, Switzerland.





# ANALISI DELLA DURATA DELLA GESTAZIONE IN UN ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO E PARAMETRI CORRELATI

## ANALYSIS OF GESTATION LENGTH AND RELATED PARAMETERS IN ONE ITALIAN SOW HERD

GUADAGNINI G.<sup>1</sup>, PONZONI D.<sup>1</sup>, OTTOLINI F.<sup>1</sup>, SALVINI F.<sup>1</sup>, GUADAGNINI M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> *PigVet, Brescia*

<sup>2</sup> *Elanco Animal Health*

**Parola chiave:** Durata della gestazione, gruppo di parto

**Key word:** Gestation length, parity group

### RIASSUNTO

La durata della gestazione è un parametro importante e spesso poco considerato. Questo lavoro analizza la durata della gestazione all'interno di una azienda della Pianura Padana. Sono stati analizzati 5106 gestazioni con parto tra novembre 2018 a dicembre 2019. Le diverse gestazioni sono state valutate mediante una divisione in classi: "gestazione corta" inferiore a 115 giorni, "gestazione normale" tra 115 e 119 giorni e "gestazione lunga" superiore a 119.

Mediante un software di elaborazione statistica sono state analizzate le differenti gestazioni e sono state evidenziate differenze significative per la "gestazione corta" in relazione al numero di nati morti ed al numero di nati morti e mummificati. La valutazione della stagionalità ha evidenziato una durata maggiore in primavera ed inverno.

### ABSTRACT

Gestation length is an important parameter not enough considered. This work analyzes the gestation length in a multi-site farrow to finish farm located in Pianura Padana. 5106 gestation with farrowing between November 2018 and December 2019 have been considered. The different gestations were analyzed and divided in 3 groups: "short gestation" with duration less than 115 days, "normal gestation" with a duration between 115 and 119 days and "long gestation" lasting over than 119 days. With a statistic software the different gestations were analyzed and the "short gestation" showed a statistic correlation with dead born piglet and also with dead born piglets + mummies.

The gestation last more during spring and winter.

### INTRODUZIONE

La durata della gestazione è un fattore determinante per la programmazione del lavoro in allevamento e deve essere considerata prima di valutare se e quando introdurre un protocollo di induzione del parto (2). Inoltre, la variabilità della gestazione influisce sulla durata della lattazione e sulla occupazione delle sale parto, determinando la necessità di svezzare suini con meno di 28 giorni di lattazione, o, in alternativa, imponendo un maggior numero di posti parto in allevamento, con conseguente aggravio di costi.

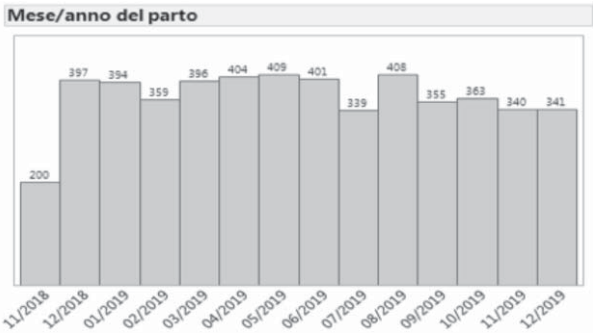
### MATERIALI E METODI

La valutazione della durata della gestazione è stata effettuata in un allevamento della Pianura Padana a ciclo chiuso multi-sito con genetica nordica, estraendo i dati dal gestionale aziendale nel quale vengono raccolti tutti gli eventi che si verificano nell'allevamento. Nel database creato per

l'analisi sono stati inseriti 5106 parti compresi tra il 15/11/2018 ed il 31/12/2019. Il database include l'identità della scrofa, la data del parto, l'ordine di parto e i dati relativi al parto: nati totali, nati vivi, nati morti e nati mummificati. Inoltre, a partire dalle precedenti variabili ne sono state create altre: mese e anno del parto, stagione del parto, gruppo di parto (primipare e pluripare), nati totali e durata della gestazione in classi. In quest'ultima variabile la gestazione è stata divisa in tre classi definite come "gestazione corta" (<115 giorni), "gestazione normale" (115-119gg) e "gestazione lunga" (>119 giorni). Il database è stato analizzato attraverso il software di elaborazione statistica JMP13 (SAS) considerando la significatività statistica per un valore di  $p < 0,05$ .

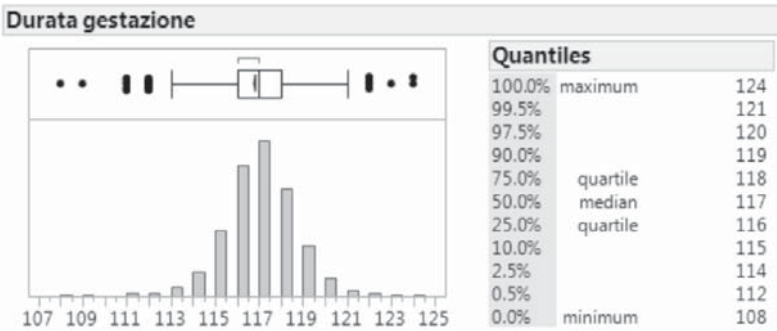
### RISULTATI

Il numero di parti per i mesi completi è risultato variabile da 339 a 409 parti e la divisione in gruppi di parto ha evidenziato come il 16% delle gestazioni si riferisca a primipare mentre l'84% a pluripare.

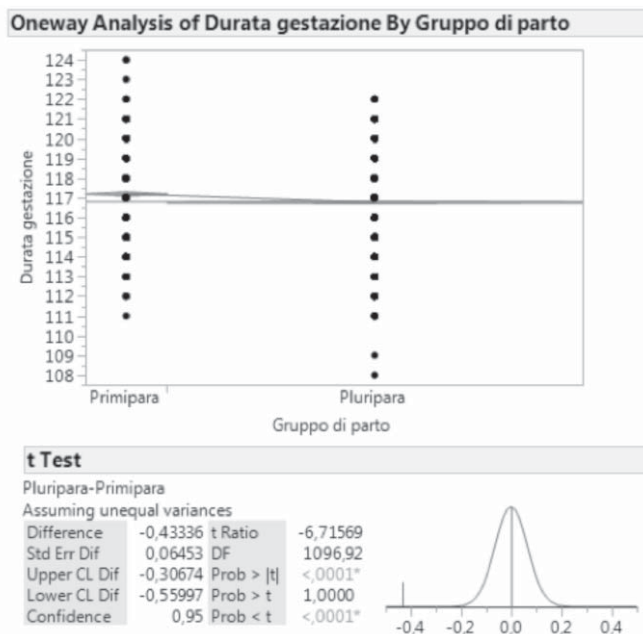


**Figura 1.** Gestazioni analizzate divise per mesi ed anni

La durata della gestazione minima rilevata è di 108 giorni mentre la durata massima è di 124 giorni. La durata media è risultata essere di  $116,8 \pm 1,56$  mentre la mediana è di 117 giorni. Se dividiamo in quartili la gestazione notiamo come il primo quartile sia posizionato a 116 giorni, mentre il terzo a 118 giorni. Se analizziamo la durata della gestazione in classi, possiamo notare come il 90% delle gestazioni possa essere definita "normale" trovandosi tra i 115 e i 119 giorni, mentre le gestazioni definite "corte" sono il 6% e quelle definite "lunghe" il 4%. La durata della gestazione analizzata per gruppo di parto è risultata più lunga nelle primipare di 0,43 giorni rispetto alle pluripare ( $p < 0,0001$ ).



**Figura 2.** Durata della gestazione



**Figura 3.** Confronto della durata di gestazione per gruppi di parto.

Dal database sono stati estratti i dati relativi ai suini nati totali, i nati vivi, i nati morti e i nati mummificati. Tali dati hanno evidenziato una variabilità per i nati totali da 0 a 35 con una media di 17,47 ed una mediana di 18; per i nati vivi una variabilità da 0 a 31 con una media di 15,86 ed una mediana di 16. Per quanto riguarda i nati morti è stata rilevata una variabilità tra 0 e 15 con una media di 0,99 ed una mediana 0, mentre per i nati mummificati la variabilità è tra 0 e 16 con una media di 0,66 ed una mediana pari a 0.

La durata della gestazione è, quindi, stata correlata con i nati morti al parto e con il totale dei nati morti e dei mummificati.

Le scrofe con “gestazione corta” presentano un maggior numero di nati morti rispetto alla “gestazione normale” e alla “gestazione lunga” rispettivamente di 0,34 e 0,39 ( $p < 0,0001$ ). Non vi è differenza statisticamente significativa tra “gestazione normale” e “gestazione lunga”. Le scrofe con “gestazione corta” presentano un maggior numero di nati morti più mummificati rispetto alla “gestazione normale” e alla “gestazione lunga” rispettivamente di 0,82 ( $p < 0,0001$ ) e di 0,45 ( $p < 0,04$ ).

In questo caso la differenza tra “gestazione lunga” e “gestazione normale” è statisticamente significativa, ovvero 0,36 ( $p < 0,03$ ).

Infine, è stata valutata la correlazione fra stagione del parto e la durata della gestazione.

Primavera ed Inverno risultano essere le stagioni di parto con gestazione più lunga senza differenze significative fra di loro. I parti autunnali presentano una durata della gestazione significativamente più breve rispetto ai parti primaverili ed invernali, ma più lunga rispetto ai parti estivi che hanno una durata di gestazione statisticamente inferiore alle altre stagioni. Ripetendo l’analisi mediante un modello multi variabile che tenga conto dell’effetto contemporaneo dell’anno di parto, del gruppo di parto, della stagione di parto e del numero dei nati totali sulla durata di gestazione, l’impatto delle suddette variabili risulta essere del tutto simile per direzione ed intensità ai risultati ottenuti dalle diverse analisi univariabili ( $p < 0,001$ ).

| Connecting Letters Report |   |           |
|---------------------------|---|-----------|
| Level                     |   | Mean      |
| Primavera                 | A | 117,01902 |
| Inverno                   | A | 116,98390 |
| Autunno                   | B | 116,73927 |
| Estate                    | C | 116,53659 |

Levels not connected by same letter are significantly different.

**Figura 4.** Durata della gestazione in relazione alle diverse stagioni di parto

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La durata della gestazione in questo allevamento che alleva una genetica nordica iperprolifica sembra essere più lunga rispetto ai dati presenti in bibliografia (1,2). Tali studi presentano una durata media di  $115,4 \pm 1,62$  e  $114,8 \pm 1,8$  giorni di gestazione. Per tale motivo nella divisione in classi sono state considerate “normali” le gestazioni tra 115 giorni e 119 giorni, poiché la durata media della gestazione di questo allevamento è  $116,8 \pm 1,56$ .

La tipologia genetica, caratterizzata da un alto numero di nati totali e nati vivi, può avere un’influenza sulla durata della gestazione di questo allevamento. In questa analisi retrospettiva la durata della gestazione risulta essere influenzata dalla stagione e dal gruppo di parto. Pertanto, è bene tenere in considerazione tali fattori poiché questa è correlata anche al numero di suini nati morti ed anche al numero di suini nati morti più mummificati.

La variabilità della gestazione è un fattore limitante all’induzione dei parti e la scelta del giorno di gestazione per l’induzione risulta complicata dal fatto che al giorno 116 solo il 25% ha partorito ed al giorno 118 il 75% delle scrofe ha partorito. L’induzione potrebbe essere poco efficace se applicata al giorno 119 poiché coinvolgerebbe solo poche scrofe mentre se applicata prima potrebbe generare la nascita forzata di suinetti non maturi. Alla luce della grande variabilità nella durata di gestazione all’interno del database, anche l’organizzazione dell’assistenza al parto in questa azienda risulta difficoltosa, soprattutto, a causa della maggiore durata della gestazione delle primipare, che rappresentano il 16% della mandria.

Nello svezzamento a banda settimanale con giorno fisso, di norma applicato nella maggior parte delle aziende da riproduzione della Pianura Padana, la variabilità della lunghezza della gestazione potrebbe essere un limite per la lunghezza della lattazione, poiché molti suinetti potrebbero non raggiungere i 28 giorni di lattazione previsti dalla normativa benessere; allo stesso tempo, si è osservato che i 21 giorni di lattazione potrebbero essere garantiti anche ai suinetti nati da scrofe con gestazioni “lunghe”.

Una limitazione della presente analisi è determinata dalla provenienza dei dati, che, seppur numerosi, riguardano una sola azienda. Sarebbe, dunque, auspicabile poter disporre in futuro di ulteriori informazioni provenienti da più realtà aziendali per poterne verificare i risultati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Vanderhaeghe C., Dewulf J., Jourquin J., Maes D. (2010) “Incidence and Prevention of early parturition in sows”. Reproduction in domestic animals, Volume 46, Issue 3
2. Tospitakul P., Kraomkaew K., Thammasin K., Uttarak P., Nuntapaitoon M., DeRensis F., Tummaruk P. (2019) “Induction of parturition by double administration of prostaglandin F2a in sows reduces the variation of gestation length without affecting the colostrum yield and piglet performance” J. Vet Med Sci 2019, 81(9):1334-1340

# SCREENING PER INFLUENZA IN DIECI ALLEVAMENTI SUINI DELLA LOMBARDIA

## FLU SCREENING IN TEN SWINE FARMS LOCATED IN LOMBARDY

GUADAGNINI G.<sup>1</sup>, PONZONI D.<sup>1</sup>, OTTOLINI F.<sup>1</sup>, COSSETTINI C.<sup>2</sup>, ZANNI I.<sup>3</sup>,  
CHIAPPONI C.<sup>3</sup>, PROSPERI A.<sup>3</sup>, LUPPI A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PigVet, Brescia; <sup>2</sup>Chemifarma S.P.A.; Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna-OIE Reference Laboratory for swine influenza

**Parole Chiave:** Virus Influenzale, sierologia, isolamento virale

**Key Words:** Flu virus, serology viral isolation

### RIASSUNTO

Lo screening per influenza eseguito in 10 allevamenti della Lombardia ha coinvolto 5 aziende con vaccinazione dei riproduttori e 5 aziende che non vaccinavano i riproduttori. Sono stati eseguiti 1200 campioni di sangue e 900 tamponi nasali, rispettivamente 120 campioni di sangue per allevamento, prelevando 30 scrofe e 90 suinetti a 30, 60 e 90 giorni di vita, e 90 tamponi prelevando i soli suinetti in svezzamento. Il confronto tra gruppi, vaccinati e non, ha sottolineato una maggior positività sierologica dei gruppi provenienti da aziende vaccinate per tutti i 4 sottotipi sia nel caso dei soli riproduttori sia nel caso dei suinetti.

L'analisi dei gruppi a diversa età ha mostrato una percentuale di positività sierologica significativa nei suini di 90 giorni, rispetto ai gruppi precedenti. L'analisi diretta per la ricerca di virus ha determinato la presenza di virus influenzali nel 70% degli allevamenti, senza una differenza significativa tra aziende vaccinate e non vaccinate. L'isolamento virale ha evidenziato la presenza di 2 allevamenti con la contemporanea circolazione di 2 sottotipi influenzali.

### ABSTRACT

The flu screening was performed in 10 farms located in Lombardy, Italy. Selected farms were divided in 5 farms vaccinating sows and 5 farms not performing the vaccination on sows. One thousand and two hundred of serum samples and 900 nasal swabs were performed divided in 120 serum samples and 90 nasal swabs per farm. Serum was collected from sows (30) and from pigs at 30, 60 and 90 days, 30 per each group. Nasal swabs were collected only from pigs. Comparison between groups derived from vaccinated farms and not vaccinated farms showed a higher positivity for vaccinated farms group for all 4 subtypes, both for sows and piglets.

Comparison among pigs at different ages showed a significant higher positivity in the 90 days group and the direct diagnosis for flu virus showed that in 70% of farms was possible to detect one or more strains. Vaccinated farms and not vaccinated farms did not show a significant difference in viral circulation. Viral isolation highlighted different subtypes circulating in two farms.

### INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria (PRDC) è uno dei principali problemi sanitari e coinvolge numerosi agenti eziologici con forte impatto sia di tipo produttivo che economico negli allevamenti suini. Tra i numerosi patogeni coinvolti, troviamo, senza dubbio, i virus influenzali.

In Italia, le forme endemiche rappresentano il 16% dei casi di influenza segnalati nei suini ed i ceppi attualmente circolanti nella popolazione suina sono H1N1, H1N2, H3N2 e H1N1pandemico (H1N1pdm). Studi genetici approfonditi sui virus recentemente rilevati sul territorio hanno mostrato una importante circolazione di virus geneticamente riassortanti.

Infezioni ricorrenti sono all'origine di eventi di riassortimento che generano nuovi ceppi virali. Negli allevamenti intensivi le infezioni sostenute da virus influenzali suini tipo A (swIAV) avvengono tutto l'anno, probabilmente favorite dalle condizioni ambientali caratteristiche degli allevamenti intensivi. Nei mesi invernali, inoltre, possono essere diagnosticate infezioni con virus influenzali di origine umana. Nella sua forma classica, swIAV è responsabile di infezioni sporadiche negli allevamenti suini, che colpisce temporaneamente gran parte della popolazione suina nell'allevamento infetto. Tuttavia, una circolazione virale persistente tra fasi epidemiche è stata descritta in allevamenti europei, in particolar modo a ciclo chiuso. Queste forme endemiche causano focolai ripetuti in gruppi di animali successivi causando problemi a livello sanitario in un contesto di PRDC.

Inoltre, la ricerca dei virus influenzali per via indiretta, tramite indagine sierologica da sangue, risulta talvolta difficoltosa, rispetto ad altre malattie del suino. Questo è dovuto principalmente alla complessità antigenica dei sottotipi influenzali circolanti, che si ripercuote sulla sensibilità del test sierologico impiegato, ossia dell'inibizione dell'emoagglutinazione.

Nel presente studio, in 10 allevamenti del nord Italia, con diverso stato sanitario (vaccinati e non vaccinati per influenza), è stato eseguito un campionamento di sangue su suini riproduttori e suinetti, per evidenziare la presenza di anticorpi per influenza H1N1 avian-like (H1N1), H1N2 human-like (H1N2), H3N2, e H1N1pdm. Parallelamente nei suini di 30, 60, 90 giorni è stato eseguito il prelievo di tamponi nasali per indagini virologiche.

## MATERIALI E METODI

Durante l'autunno 2020, tra settembre ed ottobre, è stato eseguito uno screening su 10 allevamenti suini ubicati in Lombardia. Gli allevamenti selezionati sono stati divisi in due categorie: riproduttori vaccinati e riproduttori non vaccinati per influenza.

I 5 allevamenti della categoria riproduttori vaccinati eseguivano profilassi per influenza con vaccino trivalente a tappeto ogni 4 mesi, mentre gli altri non eseguivano e non hanno eseguito in passato alcuna profilassi vaccinale per influenza.

Gli allevamenti selezionati si dividono in riproduzione a ciclo aperto, riproduzione a ciclo chiuso e riproduzione con svezzamento ed ingrasso in diverso sito (multisito) (Tabella 1).

| AZIENDA | TIPOLOGIA                 | SITI      | SCROFE | SVEZZATI E GRASSI |
|---------|---------------------------|-----------|--------|-------------------|
| F1      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | UNICO     | 760    | 4000              |
| F2      | RIPRODUZIONE CICLO CHIUSO | UNICO     | 600    | 6000              |
| F3      | RIPRODUZIONE CICLO CHIUSO | UNICO     | 250    | 3200              |
| F4      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | MULTISITO | 160    | 1700              |
| F5      | RIPRODUZIONE CICLO CHIUSO | UNICO     | 350    | 5300              |
| F6      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | UNICO     | 850    | 3000              |
| F7      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | MULTISITO | 600    | 4000              |
| F8      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | MULTISITO | 800    | 8000              |
| F9      | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | UNICO     | 600    | 3500              |
| F10     | RIPRODUZIONE CICLO APERTO | UNICO     | 380    | 2100              |

**Tabella 1.** Descrizione degli allevamenti campionati

**Table 1.** Farms' description

Gli allevamenti 1,6,7,9,10 eseguono la vaccinazione dei riproduttori a tappeto ogni 4 mesi con vaccino trivalente mentre gli altri 5 allevamenti non eseguono alcun tipo di profilassi vaccinale per influenza.



Il protocollo di studio ha previsto il campionamento di 30 scrofe e di 3 gruppi di suini con 3 differenti età per un totale di 120 campioni per allevamento, ossia 300 scrofe e 900 suinetti provenienti dai 10 allevamenti arruolati. Trenta suinetti sono stati campionati allo svezzamento, con età di circa 28 giorni, trenta suinetti con età degli animali di circa 60 giorni di vita e trenta suinetti di circa 90 giorni.

I campioni sono stati conferiti presso la sezione diagnostica di Parma dell'IZSLER e qui processati. I prelievi dei riproduttori e dei suinetti sono stati eseguiti nella medesima giornata. Il prelievo è stato eseguito mediante uso di provette senza anticoagulante e mediante portaghi munito di ago di diversa misura in base all'età e alla categoria dei suini campionati. I suinetti sono stati campionati con l'impiego di tamponi nasali sterili "Cliniswab", in plastica, puntale in viscosa e provetta contenente terreno di trasporto. I tamponi sono stati analizzati in pool di 5, eseguendo quindi 18 pool per ogni allevamento, divisi in 3 gruppi di 6 pool in base all'età dei suini campionati.

I pool sono stati testati per swIAV con metodica RT-PCR real-time sul gene codificante la proteina matrice. In caso di positività, si è effettuata la tipizzazione virale con multiplex RT-PCR così come descritto in precedenza (Chiapponi et al., 2017).

I campioni di sangue sono stati testati per la ricerca di anticorpi diretti contro virus influenzali suini mediante test di inibizione dell'emoagglutinazione (HI) utilizzando virus di riferimento (ceppi standard) circolanti sul territorio italiano: A/swine/Italy/311368/2013 H1N1 avian-like, A/swine/Italy/284922/2009 H1N2 human-like, A/swine/Italy/311349/2013 H3N2 e A/swine/Italy/282866/2013 H1N1pdm (OIE, 2018).

I risultati sono stati espressi in titoli da negativo a 1/640, con diluizioni intermedie nella prima fase descrittiva, mentre nella valutazione statistica tra gruppi sono stati considerati i campioni come positivi o negativi, indipendentemente dal titolo rilevato.

Al fine di valutare la significatività statistica dei risultati ottenuti tra i gruppi di suini provenienti da allevamenti vaccinati e non e tra le età dei suini campionati, è stata impiegata la regressione logistica lineare.

Sono stati considerati statisticamente significativi valori di  $p < 0,05$ .

## RISULTATI

### Analisi sierologica

L'analisi sierologica eseguita con test HI su tutti i campioni, scrofe e suinetti, ha evidenziato la positività anticorpale nella maggior parte dei soggetti campionati, con una percentuale di positività ad almeno un sottotipo del 72,7% (873/1200).

Valutando ogni sottotipo singolarmente, possiamo riscontrare le percentuali di positività, divise per titolo rilevato, illustrate nella Tabella 2.

|              | MEDIA       |             |             |                 |
|--------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
|              | H1N1 F1-F10 | H1N2 F1-F10 | H3N2 F1-F10 | H1N1 PAN F1-F10 |
| <b>1/20</b>  | 7,17%       | 14,33%      | 19,08%      | 13,42%          |
| <b>1/40</b>  | 6,58%       | 9,83%       | 13,75%      | 8,92%           |
| <b>1/80</b>  | 5,42%       | 8,00%       | 12,42%      | 5,58%           |
| <b>1/160</b> | 2,42%       | 5,42%       | 7,92%       | 3,42%           |
| <b>1/320</b> | 0,92%       | 1,08%       | 1,17%       | 0,95%           |
| <b>1/640</b> | 0,08%       | 0,50%       | 0,33%       | 0,08%           |
| <b>NEG</b>   | 77,42%      | 60,75%      | 46,58%      | 67,92%          |

**Tabella 2.** Sieroprevalenza del campione analizzato.

**Table 2.** Serological prevalence of the sample.

Nel gruppo dei riproduttori vaccinati, si rileva per il sottotipo H1N1 che il 47% dei soggetti non presenta anticorpi, mentre per H1N2 il 19% e per H3N2 l'8% non presentano anticorpi rilevabili con i ceppi standard impiegati nella prova sierologica (Tabella 3).

Negli allevamenti con riproduttori non vaccinati si rileva comunque presenza di anticorpi, soprattutto a basso titolo, anche se la maggior parte dei campioni risulta negativo.

Se analizziamo solamente i riproduttori, dividendoli tra allevamenti vaccinati e allevamenti non vaccinati, notiamo una significativa differenza ( $P < 0,0001$ ) tra i due gruppi come riportato in Tabella 4.

|       | H1N1          |                   | H1N2          |                   | H3N2          |                   |
|-------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|
|       | Az. vaccinate | Az. non vaccinate | Az. vaccinate | Az. non vaccinate | Az. vaccinate | Az. non vaccinate |
| 1/20  | 11,33%        | 7,33%             | 22,67%        | 16,00%            | 12%           | 24,67%            |
| 1/40  | 16,67%        | 0%                | 20%           | 7,33%             | 18%           | 6%                |
| 1/80  | 18,67%        | 0%                | 22,67%        | 0%                | 30%           | 0,67%             |
| 1/160 | 4%            | 0%                | 13,33%        | 0%                | 31,33%        | 2%                |
| 1/320 | 1,33%         | 0%                | 2%            | 0%                | 0,67%         | 0%                |
| 1/640 | 0,67%         | 0%                | 0%            | 0%                | 0%            | 0%                |
| NEG   | 47,33%        | 92,67%            | 19,33%        | 76,67%            | 8%            | 66,67%            |

**Tabella 3.** Sieroprevalenza dei riproduttori campionati divisi in sottotipi e tra allevamenti vaccinati e non.

**Table 3.** Serological prevalence of sows, considering the influenza subtypes and vaccinated/non-vaccinated status of the herds

| Az.<br>vaccinate<br>(si/no) |      | H1N1  |       |      | H1N2  |       |      | H3N2  |       |      | H1N1pan |       |
|-----------------------------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|-------|-------|------|---------|-------|
|                             |      | Pos   | Neg   |      | Pos   | Neg   |      | Pos   | Neg   |      | Pos     | Neg   |
|                             | si % | 52,67 | 47,33 |      | 80,67 | 19,33 |      | 92    | 8     |      | 54      | 46    |
|                             | no % | 23,33 | 76,67 | no % | 23,33 | 76,67 | no % | 33,33 | 66,67 | no % | 8,67    | 91,33 |

**Tabella 4.** Analisi statistica dei campioni delle scrofe divisi tra aziende vaccinate e non, per tutti i sottotipi

**Table 4.** Statistical analysis of the sow samples, divided from vaccinated farms and not for all subtypes

L'analisi dei riproduttori, per quanto riguarda i risultati della sierologia per H1N1pdm è stata dapprima eseguita aggregata, poiché nessun allevamento risulta vaccinato con il sottotipo pandemico. Il 68% dei campioni risulta negativo ma si rilevano positività superiori o uguali a 1/160 nel 4% circa dei campioni eseguiti (Tabella 5).

In seguito, applicando la divisione precedentemente utilizzata tra allevamenti vaccinati con vaccino trivalente e non, abbiamo rilevato una significativa differenza tra i due gruppi ( $P < 0,0001$ ).

Gli allevamenti non vaccinati presentano il 91% dei campioni negativi, mentre il gruppo vaccinato con vaccino trivalente presenta il 46% di campioni negativi verso il sottotipo pandemico (Tabelle 4 e 5).

|       | H1N1pdm | H1N1pdm                         |                         |
|-------|---------|---------------------------------|-------------------------|
|       |         | Riproduttori (VACC. Trivalente) | Riproduttori (non VACC) |
| 1/20  | 11,33%  | 16,67%                          | 6%                      |
| 1/40  | 8,67%   | 15,33%                          | 2%                      |
| 1/80  | 7,67%   | 14,67%                          | 0,67%                   |
| 1/160 | 2,67%   | 5,33%                           | 0%                      |
| 1/320 | 1%      | 2%                              | 0%                      |
| 1/640 | 0%      | 0%                              | 0%                      |
| NEG   | 68,67%  | 46%                             | 91,33%                  |

**Tabella 5.** Sieroprevalenza dei riproduttori campionati per H1N1pdm e divisione tra allevamenti vaccinati con vaccino trivalente e non vaccinati.

**Table 5.** Serological prevalence of sows to H1N1pdm non vaccinated and vaccinated with swine influenza trivalent vaccine.

I campionamenti eseguiti sui suinetti sono stati divisi nei due gruppi, con riproduttori vaccinati e non vaccinati ed in seguito sono stati suddivisi ulteriormente in tre gruppi in base all'età degli animali campionati (30gg, 60gg e 90gg) (Tabelle 6 e 7).

|                           |      | H1N1  |       | H1N2  |       | H3N2  |       | H1N1pdm |       |
|---------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| Az.<br>vaccine<br>(si/no) |      | Pos   | Neg   | Pos   | Neg   | Pos   | Neg   | Pos     | Neg   |
|                           | si % | 26,22 | 73,78 | 46    | 54    | 75,78 | 24,22 | 34,22   | 65,78 |
|                           | no % | 13,56 | 86,44 | 20,89 | 79,11 | 28,22 | 71,78 | 30,44   | 69,56 |

**Tabella 6.** Prevalenza sierologica nei confronti dei vari sottotipi tra suinetti di aziende vaccinate e non.

**Table 6.** Serological prevalence of different swIAV subtypes of pigs belonging to vaccinated and not vaccinated farms.

La prevalenza sierologica dei sottotipi H1N1, H1N2, H3N2, indipendentemente dall'età di prelievo dei suinetti, mostra una differenza altamente significativa ( $P < 0,0001$ ) tra il gruppo vaccinato e il gruppo non vaccinato.

Invece, non si rileva differenza significativa tra il gruppo vaccinato e quello non vaccinato per il sottotipo H1N1pdm (Tabella 6).

|                                        |           | H1N1  |       | H1N2  |       | H3N2  |       | H1N1pdm |       |
|----------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|
| eta' del suinetto<br>al prelievo in gg |           | Pos   | Neg   | Pos   | Neg   | Pos   | Neg   | Pos     | Neg   |
|                                        | 30 gg (%) | 9,67  | 90,33 | 24,33 | 75,67 | 61,33 | 38,67 | 17,67   | 82,33 |
|                                        | 60 gg (%) | 5,33  | 94,67 | 11    | 89    | 33,33 | 66,67 | 21      | 79    |
|                                        | 90 gg (%) | 44,67 | 55,33 | 65    | 35    | 61,33 | 38,67 | 58,33   | 41,67 |

**Tabella 7.** Analisi statistica dei campioni dei suinetti divisi per età di prelievo considerando tutti i sottotipi

**Table 7.** Statistical analysis of nurseries pigs divided for pig age, considering all subtypes

Per il sottotipo H1N2 il numero di campioni positivi a 30 giorni è maggiore del numero dei positivi a 60 giorni ( $P<0,001$ ) ed il numero dei positivi a 90 giorni è superiore sia ai positivi a 30 giorni sia ai positivi a 60 giorni.

Nei sottotipi H1N1 e H1N1pdm il numero dei campioni positivi a 90 giorni è significativamente maggiore dei campioni a 30 e 60 giorni ( $P<0,0001$ ).

Per quanto riguarda il sottotipo H3N2, i campioni risultati positivi a 30 giorni sono numericamente gli stessi registrati a 90 giorni (184), ed entrambi sono significativamente maggiori rispetto a quanto osservato a 60 giorni ( $P<0,0001$ ) (Tabella 7).

Analizzando il numero di campioni positivi per un solo sottotipo o più sottotipi, è stato riscontrato che nelle aziende vaccinate la percentuale di campioni positivi a più sottotipi (53,6%) è significativamente maggiore rispetto alle aziende non vaccinate (42,4%) ( $P=0,005$ ).

### Analisi virologica

I 900 tamponi totali sono stati raggruppati in 180 pool, e di questi, 34 sono risultati positivi (18,88%) in RT-PCR per swIAV. La positività ai virus influenzali ha riguardato 7 aziende su 10 (70%) (Tabelle 8 e 9).

| RIPRODUTTORI VACCINATI |        |    |    |    |    |     |
|------------------------|--------|----|----|----|----|-----|
| Età                    | N.pool | F1 | F6 | F7 | F9 | F10 |
| 30 gg                  | 1      | P  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 2      | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 3      | N  | N  | N  | P  | N   |
|                        | 4      | N  | N  | N  | P  | N   |
|                        | 5      | N  | N  | N  | P  | N   |
|                        | 6      | N  | N  | N  | P  | N   |
| 60 gg                  | 7      | P  | P  | N  | N  | P   |
|                        | 8      | N  | P  | N  | N  | P   |
|                        | 9      | N  | P  | N  | N  | N   |
|                        | 10     | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 11     | P  | P  | N  | N  | P   |
|                        | 12     | N  | P  | N  | N  | P   |
| 90 gg                  | 13     | N  | P  | N  | N  | N   |
|                        | 14     | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 15     | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 16     | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 17     | N  | N  | N  | N  | N   |
|                        | 18     | N  | P  | N  | N  | N   |

**Tabella 8.** Positività virologiche nei pool di 5 tamponi analizzati nelle aziende che vaccinano i riproduttori

**Table 8.** Virological positivity of nasal swabs analyzed in pool of 5 collected in vaccinated farms

Analizzando le aziende che vaccinano i riproduttori (Tabella 8), notiamo che 4 aziende su 5 presentano circolazione virale e che il 20% dei campioni analizzati risulta positivo. Dividendo per fasce di età abbiamo osservato la circolazione virale, a 30, 60, 90 giorni in 2, 3 e 1 azienda rispettivamente.

| RIPRODUTTORI NON VACCINATI |         |    |    |    |    |    |
|----------------------------|---------|----|----|----|----|----|
| Età                        | N. pool | F2 | F3 | F4 | F5 | F8 |
| 30 gg                      | 1       | P  | N  | N  | P  | N  |
|                            | 2       | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 3       | N  | N  | N  | P  | N  |
|                            | 4       | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 5       | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 6       | P  | N  | N  | P  | N  |
| 60 gg                      | 7       | N  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 8       | N  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 9       | N  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 10      | N  | N  | P  | N  | N  |
|                            | 11      | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 12      | P  | N  | N  | N  | N  |
| 90 gg                      | 13      | N  | N  | P  | N  | N  |
|                            | 14      | N  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 15      | N  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 16      | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 17      | P  | N  | N  | N  | N  |
|                            | 18      | P  | N  | P  | N  | N  |

**Tabella 9.** Positività virologiche nei pool di 5 tamponi analizzati nelle aziende che non vaccinano i riproduttori.

**Table 9.** Virological positivity of nasal swabs analyzed in pool of 5 collected in non vaccinated farms

Nelle aziende con riproduttori non vaccinati sono stati rinvenuti 16 pool positivi sui 90 analizzati con una percentuale di positività del 17,78% (tabelle 9 e 10).

| Az.<br>vaccinate<br>(si/no) | esito tampone nasale (Pos/Neg) |       |       |
|-----------------------------|--------------------------------|-------|-------|
|                             |                                | Neg   | Pos   |
|                             | si %                           | 80    | 20    |
|                             | no %                           | 82,22 | 17,78 |

**Tabella 10.** Presenza di esito positivo o negativo al tampone nasale in aziende vaccinate e non  
**Table 10.** positive or negative nasal swamp related to vaccinated or not farms

Non si rileva una differenza significativa relativa al fattore riproduttori vaccinati e non, per quanto riguarda la circolazione virale nei suinetti. Se consideriamo le fasce di età vi sono due aziende che presentano circolazione di virus influenzali nei suinetti svezzati di 30 giorni circa, due aziende con circolazione nei suinetti di 60 giorni e due aziende con circolazione nel gruppo a fine svezzamento (Tabella 9).

I pool risultati positivi sono quindi stati analizzati e tipizzati al fine di definire la tipologia dei sottotipi isolati (Tabella 11).

| SOTTOTIPI |         |                 |                 |           |        |
|-----------|---------|-----------------|-----------------|-----------|--------|
| F1        | H1avN2  |                 |                 |           |        |
| F2        | H1avN1  | H1huN2          | H1hu-N non tip. | H1huN2/N1 | H1huN2 |
| F4        | H1N1pdm |                 |                 |           |        |
| F5        | H1avN1  | H1av-N non tip. |                 |           |        |
| F6        | H1avN1  | H1huN2          |                 |           |        |
| F9        | H1huN2  |                 |                 |           |        |
| F10       | H1avN1  | H non tip. N1   |                 |           |        |

**Tabella 11.** Tipizzazione dei sottotipi circolanti negli allevamenti. H1hu: H1 human-like, H1av: H1 avian-like, H1hu-N non tip.: H1 human-like N non tipizzabile, H non tip. N1: H non tipizzabile N1

**Table 11.** Typing of circulating subtypes isolated in different farms. H1hu: H1 human-like, H1av: H1 avian-like, H1hu-N non tip.: H1 human-like N non typeable, H non tip. N1: H non typeable N1.

In due allevamenti (F2 e F6) sono stati rilevati due diversi sottotipi (H1N1 e H1N2) in diversi pool analizzati.

## DISCUSSIONE

Dall'analisi sierologica eseguita su campioni ematici prelevati in suini riproduttori e suinetti di 30, 60 e 90 giorni d'età in dieci allevamenti della Lombardia, si osserva che il sottotipo H3N2 è risultato essere quello caratterizzato da maggiore sieroprevalenza, seguito dal sottotipo H1N2, H1N1pdm e H1N1avian like.

Il confronto tra il gruppo vaccinato con vaccino trivalente e quello non vaccinato evidenzia, nei riproduttori campionati, una maggior presenza di campioni positivi nel primo gruppo, e questa situazione si verifica per tutti i tre sottotipi (H3N2, H1N2, H1N1avian like) seppur in misura differente. Tale situazione è compatibile con la produzione di anticorpi negli animali vaccinati che si associa all'impossibilità di discriminare la sieropositività di tipo vaccinale. Nei riproduttori, è da sottolineare che il 47% dei soggetti nel gruppo vaccinato non presentava positività anticorpale per il sottotipo H1N1 utilizzato nel test. La prevalenza di campioni negativi per lo stesso sottotipo si assestava invece al 92% nel gruppo non vaccinato.

Per quanto riguarda il sottotipo H1N1pdm, nei riproduttori si osserva positività sierologica nel 33% dei campioni aggregati, tuttavia, dividendo i campioni nei due gruppi, vaccinati con vaccino trivalente e non, possiamo notare come la positività del gruppo vaccinato sia significativamente superiore, nonostante nel vaccino trivalente non sia contenuto il sottotipo

pandemico; tale situazione potrebbe essere dovuta ad una certa immunità crociata con il sottotipo H1N1 avian-like.

L'analisi dei campioni eseguiti sui suinetti evidenzia una situazione comune in tutti i sottotipi; infatti, i gruppi campionati a 90 giorni presentano un numero significativamente superiore di campioni positivi rispetto agli altri gruppi di età di campionamento e questo è riconducibile alla circolazione attiva del virus influenzale nel gruppo.

Dall'analisi dei tamponi nasali si evince circolazione virale negli allevamenti campionati, infatti, ben 34 pool sui 180 analizzati (70%) hanno mostrato positività per virus influenzali. Questa circolazione virale è stata rilevata in 4 aziende su 5 che vaccinano i riproduttori e in 3 su 5 di quelle che non li vaccinano. Il numero dei pool positivi è di 18 per le aziende che vaccinano i riproduttori e 16 per le aziende che non vaccinano. Per quanto riguarda la rilevazione di circolazione virale non c'è differenza significativa tra le aziende che vaccinano riproduttori e quelle che non vaccinano ( $P=0,3$ ).

Questo è stato osservato da altri Autori che descrivono come la circolazione virale non sia influenzata dal fattore vaccinazione, riportando che la circolazione negli allevamenti vaccinati e non vaccinati, non sia risultata statisticamente differente (Cador et al., 2017). La vaccinazione dei riproduttori non sembra quindi influenzare la circolazione virale nei suinetti in svezzamento (Ryt-Hansen et al., 2019).

I sottotipi maggiormente rilevati con l'indagine virologica sono risultati essere H1N1 e H1N2. Questo dato è in contrasto con il risultato dell'indagine sierologica che ha invece evidenziato una maggiore sieroprevalenza nei confronti del sottotipo H3N2 che tuttavia è noto essere il sottotipo geneticamente meno variabile e verso il quale è plausibile trovare una maggiore immunità sia in animali vaccinati che non vaccinati. La maggiore variabilità dei ceppi H1N1 e H1N2, oltre a favorirne la circolazione, rende meno efficace il loro monitoraggio con metodi sierologici.

Risulta rilevante sottolineare che in nessuna di queste aziende è stata osservata una forma clinica con forme respiratorie, anoressia e ipertermia marcata, con diagnosi di influenza, durante il periodo dello studio.

Tale situazione sottolinea come la scelta di vaccinare i riproduttori sia stata fatta sulla base di segni riferibili ad influenza rilevati in passato ma anche a situazioni di rischio legate ad altre variabili aziendali che hanno portato il veterinario aziendale e l'allevatore ad inserire la vaccinazione per influenza nel piano vaccinale della mandria.

La sierologia, tuttavia, non sembra un adeguato sistema per stabilire il rischio di circolazione virale in azienda e necessita l'affiancamento della ricerca diretta del virus. La ricerca diretta, mediante tampone nasale, ha permesso di rilevare virus influenzali anche in aziende dove non era presente sintomatologia riferibile a influenza, confermando l'importanza e l'elevata frequenza della circolazione endemica dei virus influenzali negli allevamenti suini.

## CONCLUSIONE

I risultati del presente lavoro evidenziano la circolazione endemica di virus influenzali negli allevamenti campionati. In base a tale risultato, è importante considerare la vaccinazione dei riproduttori anche in assenza di casi clinici di influenza abbinando in condizioni particolari anche la vaccinazione dei suini da ingrasso. Infatti, negli allevamenti a ciclo chiuso, ma anche in quelli a ciclo aperto, che movimentano suini tra i 90 e i 100 giorni di età, possiamo incontrare una popolazione fortemente recettiva per i virus influenzali. La ricerca diretta del virus aiuta a comprendere quali siano i sottotipi circolanti e a valutare anche la necessità di utilizzo del ceppo vaccinale H1N1pdm che non è di norma abbinato agli altri sottotipi.

Considerando che ogni azienda necessita di un adeguato studio per il posizionamento della vaccinazione dei suinetti, l'aumento significativo di positività anticorpale a 90 giorni di vita



osservato nel presente lavoro, indica che la vaccinazione dei suinetti debba essere precoce, in modo che questi possano sviluppare una solida immunità prima dei 90 giorni di vita.

Visto il rinvenimento di virus influenzali già in suini a 30 giorni, il posizionamento della vaccinazione nei suinetti non può prescindere da un significativo campionamento mediante tamponi nasali per la ricerca diretta del virus.

La routine di allevamento spesso porta ad un posizionamento della vaccinazione per influenza nei suini da produzione in un periodo compreso tra i 56 e i 96 giorni di vita, con tendenza a posticipare il primo intervento attorno ai 70 giorni.

L'abbinamento della diagnosi indiretta e diretta sembra essere la migliore scelta per poter realmente comprendere la circolazione virale in un allevamento, scegliere il corretto vaccino e stabilirne il posizionamento.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Chiapponi, C., Ebranati, E., Pariani, E., Faccini, S., Luppi, A., Baioni, L., Manfredi, R., Carta, V., Merenda, M., Affanni, P., Colucci, M.E., Veronesi, L., Zehender, G., Foni, E., (2017 ).Genetic analysis of human and swine influenza A viruses isolated in Northern Italy during 2010-2015 Zoonoses Public. Health.
2. OIE (2018): Influenza A virus of swine (NB: Version adopted in May 2015). Chapter 3.8.7 in Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2019. [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.08.07\\_INF\\_A\\_SWINE.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.08.07_INF_A_SWINE.pdf)
3. Ryt-Hansen P., Larsen I., Sonne Kristensen C., Krog J.S., Wacheck S., Larsen L.E. (2019) “Longitudinal field studies reveal early infection and persistence of Influenza A virus in piglets despite the presence of maternally derived antibodies”. Veterinary Research 50,36 (2019)
4. Gramer M. (2012) “Flu control in young pigs – the role of maternal antibodies” NAVC Conference 2012 large animals
5. Cador C., Andraud M., Willem L., Rose N. (2017)“Control of endemic swine flu persistence in farrow-to-finish pig farms: a stochastic metapopulation modeling assessment”. Veterinary Research, BioMed Central, 2017, 48 (1), pp.58.

# MONITORAGGIO DEL BENESSERE ANIMALE AL MACELLO: LESIONI ALLA CODA E ALLA CUTE IN SUINI PESANTI ALLEVATI A CODA INTEGRA

## SURVEY OF ANIMAL WELFARE IN PIGS AT SLAUGHTERHOUSE: TAIL AND SKIN LESION IN HEAVY PIGS WITH INTACT TAIL

GUADAGNO F.<sup>1</sup>, MAISANO A.M.<sup>1,2</sup>, SCALI F.<sup>1</sup>, SANTUCCI G.<sup>1</sup>, GIUDICI F.<sup>1</sup>, TONNI M.<sup>1</sup>,  
IANIERI A.<sup>3</sup>, GHIDINI S.<sup>3</sup>, GUARNIERI C.<sup>3</sup>, DI MARTINO G.<sup>4</sup>, SCOLLO A.<sup>5</sup>,  
CASTELLUCCIO D.<sup>6</sup>, SANTUCCI U.<sup>6</sup>, VITALI A.<sup>7</sup>, RUSCONI C.<sup>7</sup>, CAMPANA L.<sup>7</sup>,  
VEZZOLI F.<sup>2</sup>, BERTOCCHI L.<sup>8</sup>, ALBORALI G.L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,  
Sede Territoriale di Brescia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna,  
Sede Territoriale di Lodi

<sup>3</sup> Università degli studi di Parma, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie

<sup>5</sup> Libero Professionista Suivet

<sup>6</sup> Ministero della Salute

<sup>7</sup> Unità Organizzativa Veterinaria - Regione Lombardia

<sup>8</sup> Centro di Riferenza Nazionale per il Benessere Animale (CReNBA) - IZSLER

**Parole chiave:** morsicatura della coda, benessere animale, macello

**Key words:** tail biting, animal welfare, slaughterhouse

### RIASSUNTO

Cannibalismo e aggressività rappresentano nel suino un grave problema economico e di benessere animale. Il macello è una stazione vantaggiosa per il monitoraggio di tali fenomeni attraverso la valutazione di indicatori "iceberg" quali lesioni alla coda ed alla cute. Scopo di questo studio è stato valutare queste lesioni in suini pesanti (165 kg) a coda integra. Le lesioni alla coda sono state valutate secondo 5 gradi di gravità (da 0 a *complete loss*), inoltre, è stata registrata la presenza di gonfiore o di code non intatte. Le lesioni cutanee sono state classificate in una scala da 0 a 3. Anche le lesioni alle orecchie e gli ascessi paravertebrali sono stati registrati.

La presenza di lesioni alla coda è stata ricercata, nel *post-mortem*, in 3169 suini di 20 partite provenienti da 11 allevamenti; 2585 di questi (17 partite, dieci aziende) sono stati ispezionati anche per le lesioni cutanee. Oltre il 90% delle carcasse non presentava lesioni gravi (score  $\leq 1$ ) alla coda o alla cute. La prevalenza delle lesioni è stata significativamente diversa ( $P < 0,001$ ) tra gli allevamenti. Sebbene su un campione limitato, la bassa frequenza di lesioni gravi suggerisce la possibilità di allevare suini a coda intatta nel rispetto del benessere animale. I dati di questo studio sono risultati difficilmente comparabili con quelli precedenti a causa delle differenti metodologie; si sottolinea quindi l'importanza di adottare uno standard unico e condiviso almeno a livello Comunitario.

### ABSTRACT

Cannibalism and aggression in pigs may cause severe economic loss and impair animal welfare. The slaughterhouse represents a convenient observation point to monitor those

issue considering “iceberg indicators” such as tail and skin lesions. Aim of this study was to evaluate these lesions in heavy pigs (165 kg) reared with intact tails.

Tail lesions were assessed using a five-level scoring system (0 to complete loss). Swelling and non-intact tails were also registered. Skin lesion were scored, according to severity, from 0 to 3. Ear lesions and spinal abscesses were recorded too. Tail lesions were appraised, after killing, in 3169 pigs of 20 batches from 11 farms, 2585 of those pigs (17 batches, ten farms) were also scored for skin lesions. Over 90% of the inspected carcasses did not show any severe (score  $\leq 1$ ) tail or skin lesions. Prevalence of those lesions was significantly different ( $P < 0.001$ ) among farms. Even though the sample was limited, severe lesions were uncommon which suggests that is feasible to rear heavy pigs with intact tails without jeopardising animal welfare. Data collected during this research was difficult to compare with previous study because of the different methods which highlight the importance of establish, at least at EU-level, a common standard of evaluation.

## INTRODUZIONE

Il benessere dei suini ha trovato, negli ultimi anni, sempre più spazio nei dibattiti tra l'opinione pubblica e gli stakeholder della filiera produttiva; pertanto, si è resa essenziale l'implementazione di sistemi di controllo del benessere che non si limitino agli stabilimenti di produzione primaria (allevamenti) ma che prendano in considerazione anche i macelli (EFSA, 2011). Infatti, anche il macello può costituire un punto di osservazione fondamentale per la valutazione del benessere poiché ad un singolo stabilimento conferiscono un elevato numero di animali provenienti da diversi allevamenti. Il macello rappresenta pertanto, una stazione epidemiologica importante e strategica ai fini della raccolta dati; a tale scopo i parametri più utilizzati, indicativi di benessere animale in allevamento, sono le lesioni alla cute e alla coda, i quali vengono classificati da diversi Autori come “*indicatori iceberg*” (FAWC, 2009; Van Staaveren et al., 2017a). In particolare, il monitoraggio di tali lesioni nei suini al macello ha dimostrato essere uno strumento utile per la valutazione della salute e del benessere in allevamento (EFSA 2011, Maisano et al., 2020). Le ispezioni al macello dunque potrebbero contribuire a migliorare gli standard di benessere dei suini fornendo un feedback all'allevatore, che potrà quindi adottare opportuni interventi ai fini di ridurre la prevalenza di queste lesioni così da aumentare il livello di benessere degli animali e minimizzare le perdite finanziarie da esse derivate.

La morsicatura della coda è considerata un disturbo comportamentale ad eziologia multifattoriale, che può rappresentare uno dei principali problemi di benessere nell'industria suinicola, nonché perdite economiche dovute alla riduzione dell'incremento di peso, maggiore utilizzo di farmaci e un aumento degli animali scartati a causa dell'instaurarsi di infezioni secondarie associate alle lesioni della coda (Van Staaveren et al., 2017b). In Italia, come emerso dall'ultima ispezione del *Food and Veterinary Office* (FVO) della Commissione Europea, la pratica routinaria del taglio della coda è praticata dalla quasi totalità degli allevamenti di natura intensiva (FVO, 2017). Il ricorso alla caudectomia al fine di ridurre sia le lesioni alla coda che le alterazioni comportamentali (cannibalismo), tende a mascherare quelle che sono le problematiche legate a carenze manageriali e strutturali (FVO, 2017). Prevenire la morsicatura delle code ed evitare il ricorso alla caudectomia di routine è uno degli obiettivi indicati dalla Commissione Europea per aumentare la qualità della vita dei suini e degli standard di allevamento. Tale scopo è pienamente condiviso dal Ministero della Salute, che, in collaborazione con il Centro di Riferenza Nazionale per il Benessere Animale (CReNBA), ha varato un piano d'azione nazionale. La direttiva 2008/120/CE dispone che gli Stati Membri provvedano affinché il mozzamento della coda non costituisca un'operazione di routine ma sia praticato soltanto

ove sia comprovata la presenza di ferite alle code e alle orecchie di altri suini dopo aver apportato miglioramenti strutturali e manageriali oltre i requisiti minimi.

Per quanto riguarda le lesioni cutanee, la maggior parte di quelle rilevate durante l'ispezione del macello sono di origine traumatica. Tali lesioni sono comunemente dovute ai combattimenti, che si verificano quando diversi gruppi di suini vengono mescolati insieme, come accade prima o dopo il carico per il trasporto al macello (Bottacini et al., 2018). Inoltre, lo stress causato dal trasporto, dal digiuno, il tempo di permanenza prolungato e le condizioni ambientali possono influire negativamente sul comportamento dei suini, con conseguente aumento dei danni sulla cute (Bottacini et al., 2018).

Lo scopo di questo studio è stato quello di applicare al macello una metodologia condivisa al fine valutare gli *indicatori iceberg* ad aziende che allevano suini pesanti a coda integra.

## MATERIALI E METODI

Nel periodo compreso tra Febbraio 2019 e Gennaio 2020 20 partite provenienti da undici allevamenti, per un totale di 3169 suini, sono state incluse in questo studio. Lo studio è stato condotto in tre macelli industriali ubicati in Lombardia ed Emilia Romagna, che raccolgono suini da tutto il Nord Italia. Tutte le partite considerate erano costituite da suini pesanti a coda integra. Durante le ispezioni due osservatori, veterinari appositamente formati, hanno visionato le carcasse al fine di rilevare specifiche lesioni della coda e della cute; i dati sono stati raccolti, tramite tablet, utilizzando un'applicazione del sistema di monitoraggio integrato ClassyFarm ([www.classyfarm.it](http://www.classyfarm.it)) del Ministero della Salute. I suini sono stati osservati dopo depilazione, scottatura e la divisione in mezzene, in corrispondenza del punto di ispezione veterinaria ufficiale *post-mortem* sulla linea di macellazione, ad una distanza di circa un metro.

### *Lesioni alla coda*

Le lesioni alla coda (tabella 1) sono state valutate secondo una scala da 0 a 3 (Vom Brocke et al., 2018), inoltre, sono state registrate sia la completa assenza della coda (*complete loss*) equivalente dello score 4 di Vom Brocke et al., 2018 sia la presenza di evidenti tumefazioni (gonfiore, suggestivo di infezione). Inoltre, è stato valutato il dato relativo all'integrità della coda. In figura 1 è illustrato un esempio per ciascun punteggio da 0 a 3 (figura 1A) e *complete loss* (CL; figura 1B).

**Tabella 1.** Sistema di score delle lesioni alla coda e altre valutazioni

**Table 1.** Tail lesion scoring system and other assessment

| Score/rilevazione        | Descrizione lesioni                                                       |
|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 0                        | Nessuna lesione visibile                                                  |
| 1                        | Esito di lesioni oppure ferite lievi                                      |
| 2                        | Segni di morsicatura e ferite lievi                                       |
| 3                        | Segni di morsicatura e ferite gravi e/o profonde                          |
| <b>Complete Loss (4)</b> | Perdita completa della coda, sia recente che guarita.                     |
| <b>Gonfiore</b>          | Evidenza di gonfiore alla coda, indicativa di infezione                   |
| <b>Coda non intatta</b>  | Coda più corta del normale, fine anormale con o senza presenza di lesioni |

**Figura 1.** Esempio di score da 0 a 3 (A) e complete loss (B)  
**Figure 1.** Example of scores from 0 to 3 (A) and complete loss (B)



### **Lesioni alla cute**

Il punteggio delle lesioni alla cute, descritto in tabella 2, è stato assegnato secondo una scala di gravità crescente da 0 a 3 (Aaslyng et al., 2013; van Staaveren et al., 2017a).

**Tabella 2.** Sistema di score delle lesioni cutanee

**Table 2.** Skin damage score

| Score | Descrizione                                                                                       |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0     | Assenza di lesione o presenza di un piccolo danno (graffio) superficiale                          |
| 1     | Lesioni superficiali, visibili o fino a tre lesioni corte (2-3 cm) e profonde                     |
| 2     | Lesioni profonde e/ o lunghe, maggiori di 3 cm, inclusi molti danni superficiali e aree circolari |
| 3     | Lesioni molto profonde                                                                            |

### **Altre lesioni**

Sono state inoltre registrate la presenza o assenza di lesioni alle orecchie (Maisano et al., 2020) e di ascessi paravertebrali che rappresentano una possibile conseguenza di lesioni alla coda.

### **Analisi statistica**

I dati presenti nel database del sistema ClassyFarm sono stati esportati in un formato compatibile con Microsoft Excel (Microsoft Corporation. Redmond, WA, USA), il software utilizzato per la gestione dei dati di questo studio. Eventuali differenze tra la prevalenza delle lesioni alla coda ed alla cute, per gli allevamenti inclusi nello studio, sono state investigate con un test del chi-quadro; ai fini di tali analisi gli score sono stati raggruppati due modi: assenza di lesioni (solo score 0) contro presenza di lesioni ed assenza/lesioni lievi (score 0 e score 1) contro lesioni gravi. Tutte le analisi statistiche sono state svolte con GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA).

## **RISULTATI**

Le lesioni alla coda sono state valutate in 3169 carcasse di 20 partite provenienti da 11 allevamenti, di queste: 2032 (64,1%) non presentavano lesioni; 809 (25,5%) score 1; 278 (8,8%) score 2; 25 (0,8%) score 3; 25 (0,8%) con *complete loss*. In 13 (0,4%) carcasse era inoltre presente gonfiore alla coda. In tabella 3 sono riportate le prevalenze di suini a coda non intatta e dei diversi score coda (per partita e media tra partite).

**Tabella 3.** Lesioni alla coda: prevalenza media tra partite (con intervallo di confidenza al 95%) e per singola partita. In tabella viene inoltre riportata la prevalenza di suini a coda non intatta.

**Table 3.** Prevalence of tail lesions: mean among batches (95% confidence interval) and at batch-level. The prevalence of pigs with non-intact tails is also reported.

| Partita                            | Azienda | Capi | Score Coda (%)      |                     |                  |                  | Complete Loss (%) | Coda Non intatta (%) |
|------------------------------------|---------|------|---------------------|---------------------|------------------|------------------|-------------------|----------------------|
|                                    |         |      | 0                   | 1                   | 2                | 3                |                   |                      |
| 1                                  | A       | 214  | 55,6                | 29,9                | 10,3             | 3,7              | 0,5               | 0,0                  |
| 2                                  | B       | 219  | 69,9                | 25,1                | 5,0              | 0,0              | 0,0               | 27,4                 |
| 3                                  | C       | 129  | 76,7                | 19,4                | 2,3              | 0,8              | 0,8               | 0,0                  |
| 4                                  | C       | 129  | 69,0                | 27,1                | 2,3              | 0,8              | 0,8               | 0,0                  |
| 5                                  | C       | 130  | 74,6                | 21,5                | 1,5              | 0,0              | 2,3               | 0,0                  |
| 6                                  | D       | 193  | 45,6                | 33,2                | 20,7             | 0,5              | 0,0               | 4,7                  |
| 7                                  | E       | 200  | 45,0                | 34,5                | 20,0             | 0,5              | 0,0               | 4,5                  |
| 8                                  | E       | 200  | 70,0                | 21,5                | 8,5              | 0,0              | 0,0               | 41,5                 |
| 9                                  | E       | 190  | 71,1                | 20,0                | 7,9              | 0,0              | 1,1               | 41,1                 |
| 10                                 | F       | 200  | 68,0                | 19,5                | 11,0             | 1,0              | 0,5               | 24,5                 |
| 11                                 | G       | 66   | 53,0                | 36,4                | 4,5              | 1,5              | 4,5               | 28,8                 |
| 12                                 | H       | 90   | 90,0                | 8,9                 | 0,0              | 0,0              | 1,1               | 90,0                 |
| 13                                 | I       | 161  | 67,1                | 21,7                | 10,6             | 0,6              | 0,0               | 39,1                 |
| 14                                 | I       | 239  | 51,0                | 33,9                | 13,8             | 1,3              | 0,0               | 14,2                 |
| 15                                 | I       | 161  | 58,4                | 29,2                | 9,3              | 3,1              | 0,0               | 26,1                 |
| 16                                 | L       | 191  | 50,8                | 41,9                | 5,2              | 0,5              | 1,6               | 10,5                 |
| 17                                 | L       | 191  | 85,3                | 6,8                 | 3,1              | 0,0              | 4,7               | 2,1                  |
| 18                                 | M       | 65   | 58,5                | 26,2                | 15,4             | 0,0              | 0,0               | 0,0                  |
| 19                                 | M       | 68   | 72,1                | 20,6                | 7,4              | 0,0              | 0,0               | 41,2                 |
| 20                                 | M       | 133  | 74,4                | 22,6                | 3,0              | 0,0              | 0,0               | 55,6                 |
| <b>Prevalenza media % (IC 95%)</b> |         | 3169 | 65,3<br>(67,0-63,6) | 25,0<br>(26,5-26,5) | 8,1<br>(9,0-7,1) | 0,7<br>(1,0-0,4) | 0,9<br>(1,2-0,6)  | 23,9<br>(24,2-20,9)  |

Le lesioni alla cute sono state valutate in 2585 carcasse di 17 partite provenienti da dieci allevamenti, di queste 1681 (65,0%) non presentavano lesioni cutanee; 612 (23,7%) score 1; 260 (10,1%) score 2; 32 (1,2%) score 3. Per quanto riguarda le altre lesioni, sono state rilevate lesioni alle orecchie in 26 (1,0%) carcasse ed ascessi paravertebrali in 10 (0,4%). Le prevalenze degli score cutanei e delle altre lesioni (orecchie ed ascessi paravertebrali) relative alle singole partite esaminate e la media tra partite sono riportate in tabella 4.

**Tabella 4.** Lesioni alla cute, orecchie ed ascessi paravertebrali: prevalenza media tra partite (con intervallo di confidenza al 95%) e per singola partita

**Table 4.** Prevalence of skin lesions, ear lesions, and spinal abscesses: mean among batches (95% confidence interval) and at batch-level

| Partita                        | Azienda | Capi | Score Cute (%)      |                     |                   |                  | Lesioni<br>Orecchie | Lesioni<br>paravertebrali |
|--------------------------------|---------|------|---------------------|---------------------|-------------------|------------------|---------------------|---------------------------|
|                                |         |      | 0                   | 1                   | 2                 | 3                |                     |                           |
| 1                              | A       | 214  | 67,8                | 23,8                | 6,5               | 1,9              | 1,4                 | 0,5                       |
| 2                              | B       | 219  | 68,9                | 24,2                | 5,9               | 0,9              | 0,5                 | 0,0                       |
| 3                              | C       | 129  | 58,9                | 21,7                | 19,4              | 0,0              | 0,8                 | 3,1                       |
| 4                              | C       | 129  | 62,8                | 25,6                | 11,6              | 0,0              | 3,9                 | 0,0                       |
| 5                              | C       | 130  | 53,1                | 38,5                | 8,5               | 0,0              | 4,6                 | 0,8                       |
| 8                              | E       | 200  | 66,0                | 21,0                | 12,0              | 1,0              | 0,5                 | 0,0                       |
| 9                              | E       | 190  | 67,4                | 25,8                | 6,3               | 0,5              | 1,1                 | 0,0                       |
| 10                             | F       | 200  | 39,5                | 30,5                | 27,5              | 2,5              | 0,5                 | 0,5                       |
| 11                             | G       | 66   | 69,7                | 22,7                | 6,1               | 1,5              | 0,0                 | 0,0                       |
| 12                             | H       | 90   | 58,9                | 24,4                | 15,6              | 1,1              | 0,0                 | 0,0                       |
| 13                             | I       | 161  | 54,0                | 33,5                | 9,9               | 2,5              | 0,0                 | 0,0                       |
| 14                             | I       | 239  | 54,0                | 29,3                | 16,7              | 0,0              | 1,7                 | 0,0                       |
| 15                             | I       | 161  | 60,9                | 31,1                | 5,0               | 3,1              | 1,2                 | 1,2                       |
| 16                             | L       | 191  | 94,2                | 5,8                 | 0,0               | 0,0              | 0,0                 | 0,5                       |
| 18                             | M       | 65   | 67,7                | 15,4                | 6,2               | 10,8             | 0,0                 | 0,0                       |
| 19                             | M       | 68   | 91,2                | 7,4                 | 1,5               | 0,0              | 0,0                 | 0,0                       |
| 20                             | M       | 133  | 91,0                | 6,0                 | 3,0               | 0,0              | 0,0                 | 0,0                       |
| Preval.<br>media % (IC<br>95%) |         | 2585 | 66,2<br>(68,1-64,4) | 22,7<br>(24,4-21,1) | 9,5<br>(10,6-8,4) | 1,5<br>(2,0-1,0) | 0,9<br>(1,3-0,6)    | 0,4<br>(0,6-0,1)          |

Differenze significative tra i diversi allevamenti sono state riscontrate sia per le lesioni alla coda ( $P < 0,001$ ) che per quelle alla cute ( $P < 0,001$ ) per entrambe le modalità di raggruppamento.

## DISCUSSIONE

La corretta formazione degli addetti rappresenterà un punto di notevole importanza ai fini di una futura implementazione sistematica del monitoraggio del benessere al macello. Infatti, sebbene i sistemi di scoring adottati nel presente studio siano già ampiamente codificati in letteratura (EFSA, 2007; Welfare Quality, 2009; Aaslyng et al., 2013; van Staaveren et al., 2017a; Vom Brocke et al., 2018; Maisano et al., 2020), la loro applicazione ha richiesto un'apposita formazione degli operatori coinvolti.

Per quanto riguarda le lesioni alla coda, risulta difficile un confronto diretto con altri studi poiché allo stato attuale vi sono scarse informazioni in letteratura riguardo la loro prevalenza



nel suino allevato a coda integra, in particolare per il suino pesante (165 Kg). L'adozione di diversi sistemi di punteggio, inoltre, rende il confronto ancora più complesso. Ad esempio, alcuni Autori hanno classificato le lesioni da lievi a gravi (van Staaveren et al., 2016), mentre altri hanno usato un sistema numerico su una scala da 1 a 6 (Keeling et al., 2012; Van Staaveren et al., 2017b). Inoltre, i diversi punti di osservazione sulla linea di macellazione possono portare ad una diversa interpretazione delle lesioni alla coda (Carroll et al., 2016). Infine, la prevalenza della lesione della coda può variare notevolmente anche tra le aziende (Van Staaveren et al., 2017b) ed i macelli (Harley et al., 2012); anche da questo studio sono emerse differenze significative tra le aziende sebbene la frequenza con cui sono state rilevate lesioni gravi non sia stata eccessivamente elevata (solo due partite con lesioni gravi superiori al 20%). Il 90% di animali non presentavano lesioni gravi (tabella 3) similmente a quanto riportato da un precedente studio svedese (92,9%, Keeling et al., 2012). Tuttavia risulta fondamentale considerare non solo lo score delle lesioni ma anche l'informazione riguardante la prevalenza di coda intatta o meno, infatti sia il dato medio (23,9%) che i riscontri su alcune partite mostrano prevalenze rilevanti. Nonostante i limiti del campione (ridotto numero di partite e allevamenti), tali risultati confermano che è possibile allevare suini a coda integra nel rispetto del benessere animale.

Anche nel caso dello scoring cutaneo, il paragone con studi precedenti risulta problematico viste le differenze metodologiche. Nel presente lavoro si è optato per la scala suggerita da Aaslyng e colleghi poiché risultava più pratica rispetto a quella descritta dal protocollo Welfare Quality® (2009) che prevede anche una suddivisione della carcassa in cinque regioni da valutare singolarmente prima di assegnare un punteggio finale. Inoltre, al fine di ottenere un quadro più esaustivo delle lesioni cutanee, sarebbe opportuno raccogliere i dati sia a livello di allevamento che di macello, considerando che le operazioni di carico e trasporto, soprattutto quando si mischiano suini allevati di diversi box. In particolare il digiuno, e il prolungamento dell'attesa degli animali nelle stalle di sosta, la stagione, la qualità e la durata delle operazioni di carico e scarico possono determinare situazioni di stress che possono esitare in un aumento del rischio che si manifestino comportamenti aggressivi tra soggetti (Bottacini et al., 2018). Le lesioni di tale natura, tuttavia, si evidenziano principalmente a livello craniale (Bottacini et al., 2018), pertanto, l'adozione di un sistema di scoring, separato per le lesioni craniali e quelle caudali, potrebbe rappresentare un importante aiuto nell'interpretazione dell'origine delle lesioni cutanee (allevamento o trasporto/stalla di sosta).

La prevalenza delle lesioni alle orecchie, pari a circa l'1%, è risultata inferiore a quella descritta in pubblicazioni precedenti (Dalmau et al. 2016; Bottacini et al. 2018; Maisano et al., 2020); queste differenze potrebbero essere spiegate sia dalla ridotta numerosità campionaria che dalle condizioni differenti (es. stagionalità, densità, trasporto, ecc.) in cui stati condotti gli altri studi.

## CONCLUSIONI

Per meglio interpretare i dati di monitoraggio al macello, sarebbe opportuno ampliare il campione, mantenendo l'attenzione sui suini a coda integra, e confrontare i risultati con quelli del monitoraggio in allevamento così da identificare possibili fattori di rischio e ridurre l'impatto del trasporto e la sosta sulla valutazione del benessere basata sui dati raccolti al macello.

I risultati di questo lavoro sono stati difficilmente comparabili con altri studi date le differenti metodologie descritte in letteratura; si sottolinea quindi l'importanza di adottare un sistema di scoring unico e condiviso almeno a livello nazionale o di Comunità Europea. Le osservazioni al macello, relative allo score delle lesioni alla coda e alla presenza di

code intatte o meno, sono uno degli indicatori di benessere che risulta fondamentale valutare congiuntamente al fine di stabilire per ogni allevamento un'adeguata strategia per allevare suini a coda non mozzata.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aaslyng M.D., Brandt P., Blaabjerg L., Støier S. (2013). Assessment and incidence of skin damage in slaughter pigs. In: Proceedings of the 59th International Congress of Meat Science and Technology, Izmir, Turkey
2. Bottacini M, Scollo A, Edwards SA, Contiero B, Veloci M, Pace V, et al. (2018). Skin lesion monitoring at slaughter on heavy pigs (170 kg): Welfare indicators and ham defects. *PLoS ONE* 13(11), 1-16
3. Dalmau A., Nande A., Vieira-Pinto M., Zamproga S., Di Martino G., Ribas J. C., ...& Velarde A. (2016). Application of the Welfare Quality® protocol in pig slaughterhouses of five countries. *Livestock Science*, 193, 78-87.
4. EFSA (2007). 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 (question no. EFSA-Q-2006-013). Annex to the EFSA Journal 611, 1–13
5. EFSA (2011). Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). *EFSA Journal* 9(10):2351
6. Federation Veterinary Office (FVO) (2017). extrait du rapport d'un audit effectué par la dg santé et sécurité alimentaire en Italie du 13 Novembre 2017 au 17 novembre 2017 afin d'évaluer les activités des états membres pour prévenir la caudophagie et éviter la caudectomie routinière chez les porcs. 2017-6257. Disponible sul sito: [http://ec.europa.eu/food/audits-analysis/rep\\_details\\_en.cfm?rep\\_inspection\\_ref=2017-6257](http://ec.europa.eu/food/audits-analysis/rep_details_en.cfm?rep_inspection_ref=2017-6257)
7. Harley S., More S., Boyle L., Connell N.O., Hanlon A. (2012). Good animal welfare makes economic sense: Potential of pig abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool. *Irish Veterinary Journal*, 65(1), 11.
8. Keeling L.J., Wallenbeck, A., Larsen A., Holmgren N. (2012). Scoring tail damage in pigs: an evaluation based on recordings at Swedish slaughterhouses. *Acta Veterinaria Scandinavica* 54, 32.
9. Maisano, A., Luini, M., Vitale, N., Rota Nodari, S., Scali, F., Alborali, G., & Vezzoli, F. (2020). Animal-based measures on fattening heavy pigs at the slaughterhouse and the association with animal welfare at the farm level: A preliminary study. *Animal*, 14(1), 108-118.
10. Van Staaveren N., Doyle B., Manzanilla E.G., Calderón Díaz J.A., Hanlon A., Boyle L.A. (2017a). Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of pigs. *Journal of Animal Science*, 95(4), 1528.
11. Van Staaveren N., Teixeira D.L., Hanlon A., Boyle L.A. (2017b). Pig carcass tail lesions: the influence of record keeping through an advisory service and the relationship with farm performance parameters. *Animal* 11, 140-146.
12. Van Staaveren N., Vale A.P., Manzanilla E.G., Teixeira D.L., Leonard F.C., Hanlon A. and Boyle L.A. (2016). Relationship between tail lesions and lung health in slaughter pigs. *Preventive Veterinary Medicine* 127, 21–26
13. Vom Brocke A., Karnholz C., Madey-Rindermann D., Gauly M., Leeb C., Winckler C., Dippel, S. (2019). Tail lesions in fattening pigs: Relationships with postmortem meat inspection and influence of a tail biting management tool. *Animal*, 13(4), 835-844.
14. Welfare Quality (2009). Welfare Quality® assessment protocol for pigs (sows and piglets, growing and inishing pigs). Welfare Quality® Consortium, Lel ystad, The Netherlands

# MICROBIOMA ORALE DELLE SCROFE

## ORAL MICROBIOME OF SOWS

HATTAB J.<sup>1</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>, PALLAVICINI A.<sup>2</sup>, GIONECHETTI F.<sup>2</sup>,  
MOSCA F.<sup>1</sup>, TRACHTMAN A.R.<sup>1</sup>, LANCI L.<sup>1</sup>, GABRIELLI L.<sup>3</sup>, TISCAR G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, Italia <sup>2</sup>Università di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita, Italia; <sup>3</sup>Medico Veterinario, Offida, Ascoli Piceno, Italia

**Parole chiave:** microbioma orale, scrofa, saliva

**Key words:** oral microbiome, sow, saliva

### RIASSUNTO

Il microbioma è l'insieme del materiale genetico appartenente ai microrganismi che condividono uno stesso habitat. Attraverso il microbioma è possibile conoscere le comunità che popolano determinati distretti corporei di essere umani e animali, le quali possono essere un indicatore di salute e il punto di partenza per la prevenzione di patologie. Il presente studio ha l'obiettivo di individuare il microbioma orale di scrofe sane, esistendo poca letteratura in merito. Il microbioma di 24 campioni è stato pertanto identificato tramite sequenziamento di parte del gene 16S rRNA e assegnazione delle varie sequenze a unità tassonomiche (OTU) sulla base di differenze e similitudini della regione ipervariabile V4 del gene 16S. I dati sono stati analizzati singolarmente e in seguito incrociati a seconda delle caratteristiche dei soggetti campionati (stato fisiologico, numero di parti). Dai risultati ottenuti è emersa una prevalenza dei generi *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* e *Clostridium*, mentre confrontando i vari gruppi non sono state evidenziate differenze significative. L'unica eccezione è stata rappresentata dai gruppi di gestazione e lattazione in cui, al livello di famiglie, Planococcaceae, Clostridiaceae e XI-02 sono risultati più abbondanti nelle gestanti, mentre le Micrococcaceae nelle scrofe in lattazione. Questi dati rappresentano un primo passo fondamentale nella conoscenza delle popolazioni microbiche del cavo orale della scrofa.

### ABSTRACT

Microbiome is the collective genome of the microorganism living in the same habitat. The identification of microbiome provides accurate information about the microbial communities in an individual, a key aspect in animal health and disease prevention. While pig gastrointestinal system's microbiome has been thoroughly investigated, little is known about oral microbiome composition. The aim of the present study is to outline healthy sow's oral microbiome. In total, 24 saliva samples were analyzed through part of 16S rRNA gene sequencing and allocated into operational taxonomic units (OTUs) based on the V4 hypervariable region of the gene. Data were examined both per sample and clustered according to sow physiological status, and parity. The main genera identified were *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* and *Clostridium*. The comparison between various taxonomic ranks and sow clusters outlined significant differences only at the family level. In particular, there was a prevalence of Planococcaceae, Clostridiaceae, and Family XI-02 in gestating with respect to lactating sows, and a prevalence of Micrococcaceae in lactating sows compared to gestating animals. The present data provide primary though important information on oral microbiome of sows, constituting the basis for further investigations.

## INTRODUZIONE

Con il termine “microbioma” si intende il genoma complessivo di tutti i microrganismi presenti in un determinato habitat, il quale può essere rappresentato anche da un altro organismo vivente o parte di esso (Gill et al., 2006). La composizione del microbioma di un distretto corporeo è strettamente connessa con lo stato di salute di un individuo. Pertanto, conoscerne la normale struttura è utile ai fini della prevenzione e del controllo di eventuali squilibri (He et al., 2015).

Ad oggi, sono stati eseguiti diversi studi sul microbioma intestinale del suino (Aluthge et al., 2019). Al contrario, i dati relativi al microbioma orale sono piuttosto esigui. Secondo la letteratura attualmente disponibile, le principali comunità microbiche del cavo orale del suino sono rappresentate dai generi *Streptococcus*, *Actinobacillus* e *Moraxella* (Murase et al., 2019; Bugenyi et al., 2020). Le indagini relative al microbioma tonsillare del suino hanno individuato un’importante presenza dei generi *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Moraxella* in suinetti seguiti dalla nascita allo svezzamento (Pena Cortes et al., 2018), e delle famiglie Pasteurellaceae, Moraxellaceae e Neisseriaceae nei suini in fase di ingrasso (Lowe et al., 2012). Microbioma orale e tonsillare sono considerati piuttosto simili nella specie umana (Segata et al., 2012), ma non è detto che ciò valga anche per le altre specie animali.

Sulla base di quanto sopra accennato, il presente studio si è posto l’obiettivo di aumentare le conoscenze in tema di microbioma orale del suino, con particolare riferimento al parco riproduttori.

## MATERIALI E METODI

### Animali

Il campionamento è stato effettuato presso un allevamento a ciclo chiuso di piccole dimensioni del Centro Italia. Il parco riproduttori era composto da circa 70 scrofe (ibridi commerciali) e 3 verri (Mora Romagnola). Tutti i suini oggetto di studio erano regolarmente vaccinati nei confronti della malattia di Aujeszky’s (Aujeszky A-Suivax GI, FATRO S.P.A.), della colibacillosi e delle clostridiosi (SUISENG, Hipra).

### Modalità di campionamento

Nel periodo settembre-ottobre 2020 sono stati prelevati 24 campioni di fluido orale da altrettante scrofe (Tabella 1). Le scrofe venivano alimentate *ad libitum*, con mangime privo di sostanze antimicrobiche ma additivato con fermenti lattici (Yovis, ALFASIGMA). La saliva **è stata prelevata con un apposito kit** commerciale (PRRS check by Unistrain, Hipra), utilizzato secondo le istruzioni del produttore. I campioni sono stati trasportati in laboratorio in un contenitore refrigerato, aliquotati in provette da 2 mL e stoccati a -69°C.

**Tabella 1.** Caratteristiche principali delle scrofe campionate

**Table 1.** Main Features Of Sampled Sows

| Tipologia animali    | Numerosità |
|----------------------|------------|
| Scrofette            | 2          |
| Scrofe primipare     | 6          |
| Scrofe pluripare     | 16         |
| Scrofe in gestazione | 10         |
| Scrofe in lattazione | 9          |

## Indagini biomolecolari

L'analisi dei campioni è stata eseguita presso il Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste. Il DNA è stato estratto con il kit E.Z.N.A® Universal Pathogen (Omega Bio-Tek) a partire da 250 µl di saliva, ed eluito in 55 µL di tampone (incluso nel kit). L'estratto è quindi stato mantenuto a -20°C fino al suo utilizzo. Qualità e quantità del DNA estratto sono stati valutati tramite spettrofotometria (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific), ed è stata utilizzata come controllo negativo un'estrazione a vuoto per escludere eventuali contaminazioni degli estratti. In seguito, è stata effettuata l'amplificazione della regione V4 del gene 16S rRNA utilizzando i primer 515F, (Caporaso et al., 2011), 802R (Claesson et al., 2009) e 806R (Caporaso et al., 2011). Ai primer sono state abbinate sequenze diverse, ricche in CG, come codice a barre a fini identificativi. La prima PCR è stata eseguita in un volume di 20 µL, contenenti 10µL di AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio), 1µL EvaGreen™ 20X (Biotium), 0,8µL 515 F (10µM-5' modified with unitail 1 -CAGGACCAGGGTACGGTG-), 0,4 µL 802 R (10µM-5' modificato con una sequenza iniziale di 2-CGCAGAGAGGCTCCGTG-), 0,4µL 806 R (10µM-5' modificato con una sequenza iniziale di 2-CGCAGAGAGGCTCCGTG-), e 50 ng di DNA. L'amplificazione è stata eseguita con CFX 96™ PCR System (Bio-Rad) secondo il seguente protocollo: 94 °C for 20 s, 55 °C for 20 s, 72 °C for 60 s. La seconda PCR (PCR esterna) è stata effettuata per etichettare ogni campione in modo univoco, utilizzando un primer *forward* costituito da un adattatore 'A', un codice a barre campione-specifico da 10 paia di basi e dalla coda 1 dei primer utilizzati nella prima PCR. Il primer *reverse* era composto da un adattatore P1 e dalla coda 2. Le reazioni sono state eseguite in un volume di 25µL contenenti 12,5µL AccuStartII PCR ToughMix 2X (Quanta Bio), 1,25µL EvaGreen™ 20X (Biotium), 1,5µL primer corredato da codice a barre (10 µM), 1µL della prima PCR secondo il seguente protocollo: 8 cicli 94 °C per 10 s, 60°C per 10 s, 65 °C per 30 s e un'estensione finale di 72 °C per 2 min. La qualità e le dimensioni di tutti gli amplificati tramite elettroforesi su gel di agarosio, purificati con Mag-Bind® TotalPure NGS (Omega Bio -Tek), quantificati con Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) e raggruppati a seconda della molarità. Infine, la libreria è stata controllata con elettroforesi su gel di agarosio e quantificata con Qubit Fluorometer. Ai fini del sequenziamento, la libreria è stata per prima cosa sottoposta a PCR con Sistema Ion OneTouch™ 2, utilizzando il modello Ion PGM™ Template Hi-Q OT2 View (Life Technologies) secondo le istruzioni del produttore. Infine, le Ion sphere particles (ISP) sono state arricchite tramite modulo E/S. Le ISP così ottenute sono state caricate e sequenziate con un chip Ion 316 (Life Technologies) con sistema Ion Torrent PGM.

## Analisi dei dati

Una volta ottenute le sequenze, queste sono state importate in CLC Microbial Genomics Module (CLC Genomics Workbench 20.0, QIAGEN Digital Insights, Aarhus, Denmark) e sottoposte a controllo qualità. Successivamente, sono stati rimossi gli adattatori e sono state escluse tutte le sequenze inferiori alle 150 paia di basi. Le sequenze sono state quindi assegnate a delle OTU in seguito al confronto con il database SILVA 16S v13297%, ne è stata ricostruita la tassonomia (*maximum likelihood phylogenetic tree*), ed è stata condotta un'analisi dell'alfa diversità. In questo modo è stato possibile osservare la composizione microbica e la variabilità media delle specie presenti in ciascun campione.

## Analisi statistica

I dati sono stati analizzati con il software Jamovi, verificando la normalità della distribuzione dei dati con il test di Shapiro-Wilk. Sono stati, quindi, impiegati il test T di *Student* ed il test U di *Mann-Whitney*, a seconda che la distribuzione dei dati fosse o meno normale.

## RISULTATI

Da ogni campione sono state ottenute 155,962-48,911 sequenze della regione V4 del gene 16S rRNA. Complessivamente, sono stati identificati oltre 100 filotipi. Gli ordini prevalenti nei campioni analizzati sono risultati appartenere ai phyla Firmicutes (Lactobacillales, Clostridiales, Bacillales and Erysipelotrichales), Actinobacteria (Corynebacteriales and Micrococcales), e Proteobacteria (Pseudomonadales), mentre delle 241 famiglie individuate, le più numerose riscontrate erano Corynebacteriaceae, Lactobacillaceae, Aerococcaceae, Moraxellaceae and Staphylococcaceae. Al livello di genere, è stata riscontrata un'alta numerosità di *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Acinetobacter*, *Aerococcus* and *Clostridium*. Dal confronto fra i vari gruppi e livelli tassonomici, non sono emerse differenze statisticamente significative ( $p>0.05$ ). Esclusivamente tra i gruppi di scrofe gestanti e scrofe in lattazione sono stati individuati gruppi tassonomici prevalenti nell'una o nell'altra categoria. Infatti, al livello di famiglie, Planococcaceae, Clostridiaceae e XI-02 sono risultate essere più abbondanti nelle gestanti, mentre le Micrococccaceae più numerose nelle scrofe in lattazione.

## DISCUSSIONE

Nel corso degli ultimi anni, il microbioma orale è stato oggetto di attenzione crescente, soprattutto nell'uomo (Hillman et al., 2017) e sporadicamente nel bovino (Borsanelli et al., 2018), nel cavallo (Kennedy et al., 2016) e negli animali da compagnia (Rodrigues et al., 2019; Ruparell et al., 2020). Nel suino, i dati attualmente disponibili sono piuttosto esigui ed eterogenei (Murase et al., 2019; Bugenyi et al., 2020). I risultati delle nostre indagini divergono notevolmente da quanto disponibile in letteratura. Ciò è potenzialmente riferibile ad una serie di variabili, tutte meritevoli di ulteriore attenzione: età dei suini oggetto di studio, modalità di prelievo del fluido orale, integrazione del mangime con fermenti lattici, esposizione a sostanze antimicrobiche etc. Ad esempio, l'esposizione protratta a lincosamidi è stata recentemente messa in relazione con l'aumento relativo di *Clostridium*, *Aerococcus* e *Corynebacterium* (Jo et al., 2021), come in parte documentato anche nel nostro studio. Le differenze qui osservate fra scrofe lattanti e gestanti ricalcano quanto riportato in campo umano, sebbene restino da chiarire le ragioni di tali variazioni (Williams et al., 2019).

## CONCLUSIONI

Per quanto preliminari, i dati qui riportati offrono un utile contributo alla conoscenza del microbioma orale del suino, fornendo parametri di riferimento per indagini future. L'analisi di un numero crescente di campioni, associato ad un controllo più stringente delle variabili in gioco, consentirà di avere un quadro più solido del microbioma orale dei riproduttori e del significato pratico da attribuire ad eventuali variazioni.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aluthge N.D., Van Sambeek D.M., Carney-Hinkle E.E., Li Y.S., Fernando S.C., Burkey T.E. (2019) "BOARD INVITED REVIEW: The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health1". J Anim Sci. 97(9):3741-3757.
2. Borsanelli A. C., Lappin D. F., Viora L., Bennett D., Dutra I. S., Brandt B. W., Riggio M. P. (2018) "Microbiomes associated with bovine periodontitis and oral health". Vet microbiol, 218, 1-6.
3. Bugenyi A.W., Cho H.S., Heo J. (2020) "Association between oropharyngeal microbiome and weight gain in piglets during pre and post weaning life". J Anim Sci Technol. 62(2):247-262.



4. Caporaso J.G., Lauber C.L., Walters W.A., Berg-Lyons D., Lozupone C.A., Turnbaugh P.J., Fierer N., Knight R. (2011). "Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample". *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15;108 Suppl 1(Suppl 1):4516-22.
5. Claesson M.J., O'Sullivan O., Wang Q., Nikkilä J., Marchesi J.R., Smidt H., De Vos W.M., Ross R.P., O'Toole P.W., (2009). "Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine". *PloS One*,20;4(8):e6669.
6. Gill S.R., Pop M., Deboy R.T., Eckburg P.B., Turnbaugh P.J., Samuel B.S., Gordon J.I., Relman D.A., Fraser-Liggett C.M., Nelson K.E. (2006) "Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome". *Science*. 2;312(5778):1355-9.
7. He J., Li Y., Cao Y., Xue J., Zhou X. (2015) "The oral microbiome diversity and its relation to human diseases". *Folia Microbiol (Praha)*. 60(1):69-80.
8. Hillman E. T., Lu H., Yao T., Nakatsu C. H. (2017) "Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract". *Microbes and environ*, 32(4), 300–313.
9. Jo H. E., Kwon M. S., Whon T. W., Kim D. W., Yun M., Lee J., Shin M. Y., Kim S. H., Choi H. J. (2021) "Alteration of Gut Microbiota After Antibiotic Exposure in Finishing Swine". *Front microbiol*, 12, 596002.
10. Kennedy, R., Lappin, D. F., Dixon, P. M., Buijs, M. J., Zaura, E., Crielaard, W., O'Donnell, L., Bennett, D., Brandt, B. W., & Riggio, M. P. (2016) "The microbiome associated with equine periodontitis and oral health". *Veterinary research*, 47, 49.
11. Lowe B.A., Marsh T.L., Isaacs-Cosgrove N., Kirkwood R.N., Kiupel M., Mulks M.H. (2012) "Defining the "core microbiome" of the microbial communities in the tonsils of healthy pigs". *BMC Microbiol*. 7;12:20.
12. Murase K., Watanabe T., Arai S., Kim H., Tohya M., Ishida-Kuroki K., Vö T.H., Nguyễn T.P.B., Nakagawa I., Osawa R., Nguyễn N.H., Sekizaki T. (2019) "Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota". *PLoS One*. 24;14(4):e0215983.
13. Pena Cortes L.C., LeVeque R.M., Funk J., Marsh T.L., Mulks M.H. (2018) "Development of the tonsillar microbiome in pigs from newborn through weaning". *BMC Microbiol*. 16;18(1):35.
14. Rodrigues M. X., Bicalho R. C., Fiani N., Lima S. F., Peralta S. (2019) "The subgingival microbial community of feline periodontitis and gingivostomatitis: characterization and comparison between diseased and healthy cats". *Sci rep*, 9(1), 12340.
15. Ruparell A., Inui T., Staunton R., Wallis C., Deusch O., Holcombe L. J. (2020) "The canine oral microbiome: variation in bacterial populations across different niches". *BMC microbiol*, 20(1), 42.
16. Williams J. E., Carrothers J. M., Lackey K. A., Beatty N. F., Brooker S. L., Peterson H. K., Steinkamp K. M., York M. A., Shafii B., Price W. J., McGuire M. A., McGuire M. K. (2019) "Strong Multivariate Relations Exist Among Milk, Oral, and Fecal Microbiomes in Mother-Infant Dyads During the First Six Months Postpartum". *J nutr*, 149(6), 902–914.
17. Segata N., Haake S. K., Mannon P., Lemon K. P., Waldron L., Gevers D., Huttenhower C., Izard, J. (2012) "Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples". *Genome biol.*, 13(6), R42.





# LO SVEZZAMENTO TARDIVO È ASSOCIATO AD UNA MAGGIORE DIVERSITÀ MICROBICA ED UNA ABBONDANZA DI *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* NEL MICROBIOTA FECALE DEI SUINETTI

## **LATE WEANING IS ASSOCIATED WITH INCREASED MICROBIAL DIVERSITY AND *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* ABUNDANCE IN THE FECAL MICROBIOTA OF PIGLETS**

MASSACCI F.R.<sup>1,2,3</sup>, BERRI M.<sup>4</sup>, LEMONNIER G.<sup>1</sup>, GUETTIER E.<sup>5</sup>, BLANC F.<sup>1</sup>,  
JARDET D.<sup>1</sup>, ROSSIGNOL M.N.<sup>1</sup>, MERCAT M.J.<sup>6</sup>, DORÉ J.<sup>7,8</sup>, LEPAGE P.<sup>7</sup>,  
ROGEL-GAILLARD C.<sup>1</sup>, ESTELLÉ J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>GABI, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78350 Jouy-en-Josas, France

<sup>2</sup>Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, Bologna, Italy

<sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', Perugia, Italy

<sup>4</sup>ISP, INRA, Université Tours, Nouzilly, France

<sup>5</sup>UE PAO, INRA, Nouzilly, France

<sup>6</sup>IFIP-Institut du porc and Alliance R&D, Le Rheu, France

<sup>7</sup>MICALIS, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

<sup>8</sup>MetaGenoPolis, INRA, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France

**Parole chiave:** suinetto, microbiota intestinale, età allo svezzamento

**Keywords:** piglet, gut microbiota, weaning age

### RIASSUNTO

Lo svezzamento rappresenta un momento cruciale nell'allevamento suinicolo ed è caratterizzato da stress nutrizionale, ambientale e sociale. In questa fase, la fisiologia intestinale dei suinetti deve adattarsi ai cambiamenti alimentari. I suinetti svezzati tardivamente mostrano migliori condizioni di salute, peso e tassi di mortalità ridotti. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto dell'età allo svezzamento sulla diversità e sulla composizione del microbiota fecale dei suinetti. Quarantotto suinetti sono stati divisi in 4 gruppi, svezzati a diverse età: 14, 21, 28 e 42 giorni (svezzamento tardivo). La composizione del microbiota è stata valutata il giorno dello svezzamento, 7 giorni post-svezzamento e a 60 giorni di età, sequenziando il gene del 16S rRNA. I risultati mostrano differenze nella composizione del microbiota fecale prima e dopo lo svezzamento, confermando come questo modifichi drasticamente il microbiota intestinale. La diversità  $\alpha$  e la ricchezza della microflora intestinale sono risultate maggiori nei suinetti svezzati a 42 giorni sia il giorno dello svezzamento che 7 giorni dopo. Inoltre, l'abbondanza delle unità tassonomiche operative (OTU) riferibili a *Faecalibacterium prausnitzii* era maggiore nel gruppo svezzato a 42 giorni di età. In conclusione, lo svezzamento tardivo aumenta la diversità del microbiota intestinale e l'abbondanza di *F. prausnitzii*, già riconosciuto positivo per l'uomo, indicando come questa pratica sia favorevole per la salute intestinale dei suinetti. La composizione della flora intestinale descritta nei suinetti svezzati tardivi potrebbe indirizzare allo sviluppo di probiotici di nuova generazione per mitigare lo stress nella fase di svezzamento.

### ABSTRACT

In pig production systems, weaning is a crucial period characterized by nutritional, environmental, and social stresses. In this process, piglets' gut physiology has to adapt from

a milk-based diet to a solid and more complex plant-based feed. It is known that piglets weaned later display improved health, better wean-to-finish growth performance, and lower mortality rates. The aim of this study was to evaluate the impact of weaning age on fecal microbiota diversity and composition in piglets. Forty-eight Large White piglets were divided into 4 groups of 12 animals that were weaned at different ages: 14 days, 21 days, 28 days and 42 days (late weaning). Microbiota composition was assessed by sequencing the 16S rRNA gene using fecal samples taken on the day of weaning, 7 days later, and at 60 days of age. In each group, there were significant differences in fecal microbiota composition before and after weaning, confirming that weaning can drastically change the gut microbiota. Microbiota diversity was positively correlated with weaning age: microbial  $\alpha$  diversity and richness were higher in piglets weaned at 42 days of age both on the day of weaning and 7 days later. The abundance of *Faecalibacterium prausnitzii* operational taxonomic units (OTUs) was also higher in piglets weaned at 42 days of age. Overall, these results show that late weaning increased gut microbiota diversity and the abundance of *F. prausnitzii*, a microorganism with positive effects in humans. Piglets might thus derive a competitive advantage from later weaning because they have more time to accumulate a higher diversity of potentially beneficial microbes prior to the stressful weaning period.

## INTRODUZIONE

Lo svezzamento rappresenta un momento cruciale nell'allevamento suinicolo ed è caratterizzato da stress nutrizionale, ambientale e sociale (Colson *et al.*, 2012; Lallés *et al.*, 2007) e da un'anoressia transitoria post-svezzamento con conseguente perdita di peso (Lallés *et al.*, 2007). In questa fase, i suinetti presentano un rischio maggiore di insorgenza di diarrea in quanto la microflora intestinale deve adattarsi ai cambiamenti alimentari legati al passaggio da una dieta lattea ad un alimento solido a base di cereali e più complesso e all'elevata pressione microbica ambientale (Gresse *et al.*, 2017; Lallés *et al.*, 2007) disturbed absorptive–secretory electrolyte balance and altered local inflammatory cytokine patterns after weaning. These responses appear to operate according to two distinct temporal patterns, an acute response followed by a long-lasting adaptation response. Pigs coexist with a diverse and dense commensal microbiota in their gastrointestinal tract. Most of these microbes are beneficial, providing necessary nutrients or protection against harmful pathogens for the host. The microbial colonisation of the porcine intestine begins at birth and follows a rapid succession during the neonatal and weaning period. Following the withdrawal of sow's milk the young piglets are highly susceptible to enteric diseases partly as a result of the altered balance between developing beneficial microbiota and the establishment of intestinal bacterial pathogens. The intestinal immune system of the newborn piglet is poorly developed at birth and undergoes a rapid period of expansion and specialisation that is not achieved before early (commercial).

Il microbiota intestinale suino si compone di una vasta e diversificata popolazione di batteri che svolgono un ruolo significativo nella salute del suino stesso. Nei suini, come negli altri mammiferi, l'impianto del microbiota inizia alla nascita (Thompson *et al.*, 2008) diet and the developmental changes of the host. Denaturing gradient gel electrophoresis was used to follow the individual community dynamics of 24 piglets over the period of 3-36 days after birth. The community of piglets older than 31 days was inferred to show high stability relative to the first 28 days post birth. The stable day 36 community showed significant correlation between cohabiting piglets, but not between siblings. This cohabitation effect was not observable in 1- or 2-week-old piglets but was strongest at either 3 or 4 weeks post birth. The onset of this change after 2 weeks is predicted to be after the development of key induction elements of the immune system and before significant levels of piglet sIgA were observable (4 weeks. Dalla nascita allo svezzamento e al periodo post-svezzamento, il microbiota intestinale risulta dinamico e subisce importanti cambiamenti di composizione in

base all'età, all'esposizione ad agenti patogeni, all'ambiente e alla dieta (Mach *et al.*, 2015) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth. In letteratura è riportato che lo svezzamento di suini allevati in condizioni naturali si verifica tra le 11-12 settimane (Bøe, 1991) e le 17 settimane di età (Jensen and Recén, 1989). Al contrario, nell'allevamento intensivo, lo svezzamento si verifica tra la terza e la quarta settimana di età. Gli studi che hanno confrontato età diverse allo svezzamento hanno dimostrato come ritardare l'età dello svezzamento possa migliorare le condizioni di salute, contrastare la perdita di peso e ridurre i tassi di mortalità dei suinetti (Davis *et al.*, 2006). Tuttavia, sono stati condotti pochi studi su come l'età allo svezzamento influenzi il microbiota intestinale del suinetto. Lo scopo del presente lavoro è stato, dunque, quello di caratterizzare le dinamiche del microbiota intestinale in suinetti *antibiotic-free* svezzati a differenti età e di descrivere le differenze del microbiota fecale tra lo svezzamento precoce e quello tardivo.

## MATERIALI E METODI

### *Disegno sperimentale*

Nel nostro studio, abbiamo utilizzato 48 suinetti (23 femmine e 25 maschi) allevati presso l'allevamento sperimentale dell'INRA a Nouzilly (Francia). I suinetti sono stati randomizzati ed assegnati a quattro gruppi svezzati a età diverse: 14 giorni (W14), 21 giorni (W21), 28 giorni (W28) e 42 giorni (W42). Nessuno dei suinetti è stato trattato con antibiotici durante lo studio. I maiali erano privi di agenti patogeni principali e di *E. coli* Enterotossigeno, la cui presenza/assenza è stata testata mediante PCR (Casey and Bosworth, 2009) su campioni fecali. I campioni fecali sono stati collezionati da ampolla rettale il giorno dello svezzamento, 7 giorni post-svezzamento e a 60 giorni di età. Tutti i campioni fecali sono stati congelati direttamente in azoto liquido e poi conservati a -80° C fino al momento dell'analisi.

### *Estrazione del DNA fecale, sequenziamento del gene 16S rRNA ed elaborazione dei dati bioinformatici*

Una versione modificata del protocollo sviluppato da Godon *et al.* (Godon *et al.*, 1997) è stato usato per l'estrazione del DNA (Massacci *et al.*, 2020). Il profilo microbico è stato ottenuto sequenziando le regioni ipervariabili V3-V4 del gene 16S rRNA, utilizzando lo strumento MiSeq Illumina e seguendo le specifiche del protocollo Illumina, avvalendosi dei seguenti primer: PCR1F\_343 (5'-CTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG-3') e PCR1R\_784 (5'-GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTACCAGGGTATCTAATCCT-3').

Le *reads* generate nel formato FastQ, sono state valutate qualitativamente con il FastQC software e successivamente analizzate utilizzando la pipeline Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) v1.9.1 (Caporaso *et al.*, 2010), seguendo la strategia di *open-reference sub-sampled OTU calling* utilizzando GreenGenes (Rideout *et al.*, 2014) e creando le *Operational Taxonomic Units* (OTUs) con un grado di similarità del 97%. Le OTU con un numero inferiore allo 0,005% del numero totale di sequenze sono state rimosse dal dataset (Bokulich *et al.*, 2012). Le sequenze chimeriche sono state rimosse usando la pipeline QIIME. Tutti i campioni con meno di 10000 reads sono stati eliminati dalla successiva analisi statistica.

### *Analisi biostatistiche*

L'elaborazione è stata effettuata tramite programma R (v. 3.5.1) (TeamCore, 2018). Per l'analisi del microbiota fecale, la tabella delle OTU è stata importata in R con il pacchetto Phyloseq (v. 1.24.2) (McMurdie and Holmes, 2013) genetics, phylogenetics, multivariate statistics, visualization and testing. With the increased breadth of experimental designs now being pursued, project-specific statistical analyses are often needed, and these analyses are often difficult (or impossible). Utilizzando il pacchetto Vegan v. 2.5-2 (Oksanen, 2015) le

diversità  $\alpha$ ,  $\beta$  e la richness della composizione del microbiota sono state calcolate a livello di OTU. La diversità  $\alpha$  è stata calcolata utilizzando l'indice di Shannon, mentre per la diversità  $\beta$  è stato impiegato l'indice di Whittaker. L'analisi della varianza (ANOVA) è stata calcolata, insieme al Tukey Honest Significant Differences per la  $\alpha$  e diversità  $\beta$  dei gruppi sperimentali. La distanza Bray-Curtis è stata utilizzata per l'analisi del Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS), utilizzando il pacchetto Vegan. Inoltre le ipotesi nulle di nessuna differenza all'interno dei gruppi sono state testate tramite la funzione "envfit" e la funzione "adonis" per l'analisi multivariata, usando per entrambi i test la distanza di Bray-Curtis. L'analisi differenziale è stata effettuata a livello di OTU utilizzando il pacchetto metagenomeSeq (Paulson *et al.*, 2013).

## RISULTATI

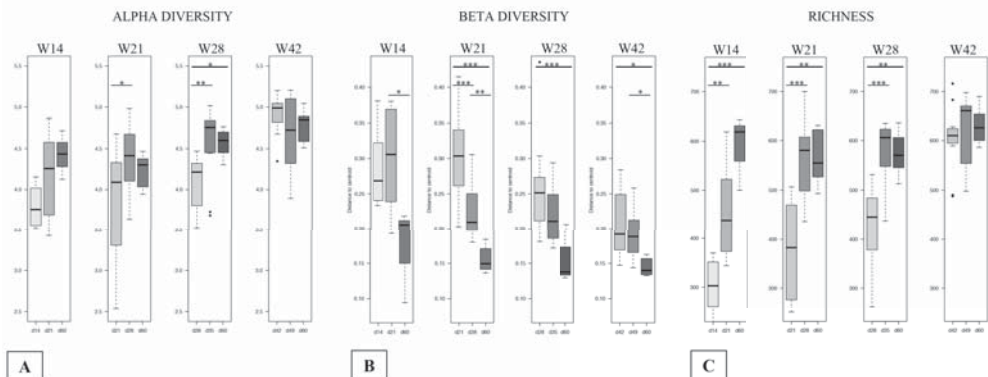
### *Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale*

Prendendo in considerazione ogni gruppo sperimentale, abbiamo descritto differenze significative ( $p < 0,05$ ) per la diversità  $\alpha$  e la ricchezza microbica tra i diversi momenti di campionamento in ciascun gruppo ad eccezione del gruppo W42. In quest'ultimo, solo la diversità  $\beta$  differiva significativamente. Le differenze descritte erano principalmente tra il campionamento del pre e del post-svezzamento. Inoltre, abbiamo osservato che la diversità  $\beta$  è diminuita tra i 7 giorni post-svezzamento e 60 giorni di età in tutti i gruppi, ad eccezione del gruppo W14 (Figura 1).

Nel plot NMDS, chiare differenze per i gruppi W14, W21 e W28, sono state riportate nei tre punti di campionamento. Al contrario, il gruppo W42 presentava i centroidi sovrapposti dei campioni collezionati 7 giorni post-svezzamento e 60 giorni di età. L'analisi differenziale ha descritto all'interno del gruppo W14 224 OTU differentemente abbondanti (DA), e nel gruppo W21 un totale di 484 OTU DA. Nei gruppi W28 e W42, erano rispettivamente descritte 395 e 461 OTU DA. Complessivamente, *Bacteroides*, *Ruminococcus*, *Oscillospira* e *Clostridium* sono stati risultati più abbondanti prima dello svezzamento mentre *Succinivibrio*, *Prevotella* e *Campylobacter* più abbondanti 7 giorni post-svezzamento. *Faecalibacterium prausnitzii* è risultato più abbondante nel post-svezzamento in tutti i gruppi.

**Figura 1:** Boxplot rappresentanti la diversità alfa (A), diversità beta (B) e ricchezza (C) per ciascun time point dei suinetti svezzati a 14 giorni di età (W14), 21 giorni di età (W21), 28 giorni di età (W28) e 42 giorni di età (W42). Eventuali differenze statistiche sono indicate nella figura (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

**Figure 1:** Boxplots of alpha diversity (A), beta diversity (B), and richness (C) for each sampling point for piglets weaned at 14 days of age (W14), 21 days of age (W21), 28 days of age (W28), and 42 days of age (W42). Any statistical differences are indicated in the figure (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , and \*\*\* $p < 0.001$ ).

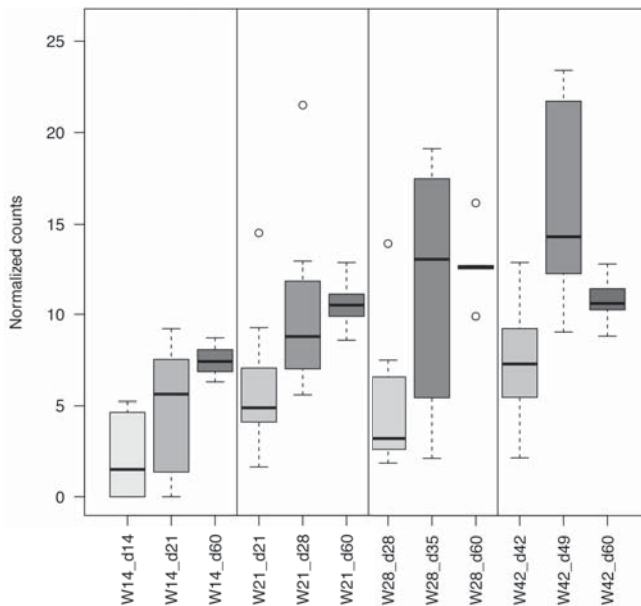


### Effetto dell'età di svezzamento sull'abbondanza di *F. prausnitzii*

In tutto il dataset, tre OTU sono state annotate come *F. prausnitzii* (ID OTU 851865, 350121 e 525215). Poiché almeno una di queste OTU era DA nella maggior parte delle analisi, abbiamo deciso di esplorare l'abbondanza complessiva di *F. prausnitzii* sommando le abbondanze delle tre OTU per ciascun campione. In ogni gruppo di svezzamento, si è verificato un chiaro aumento nel tempo dell'abbondanza di *F. prausnitzii* e nel gruppo W42 sono stati osservati i valori maggiori (Figura 2). Nei gruppi W14 e W21, si è assistito ad un marcato aumento dell'abbondanza tra lo svezzamento e il giorno 60, mentre nei gruppi W28 e W42 l'abbondanza tendeva ad essere più stabile 7 giorni post-svezzamento. Allo svezzamento, *F. prausnitzii* era più abbondante nel gruppo W42, equamente abbondante nei gruppi W21 e W28 e meno abbondante nel gruppo W14. Sono state rilevate differenze significative tra i quattro gruppi di svezzamento ( $p < 0,05$ ) e *F. prausnitzii* si è dimostrato più abbondante prima dello svezzamento in suinetti svezzati in età avanzata.

**Figura 2:** Abbondanza di *F. prausnitzii* in ciascun time point dei suinetti svezzati a 14 giorni di età (W14), 21 giorni di età (W21), 28 giorni (W28) e 42 giorni (W42). Le abbondanze normalizzate delle tre OTU annotate come *F. prausnitzii* (ID OTU 851865, 350121 e 25215) sono state sommate per ogni singolo campione.

**Figure 2:** Abundance of *F. prausnitzii* at each sampling point for piglets weaned at 14 days of age (W14), 21 days of age (W21), 28 days of age (W28), and 42 days of age (W42). The normalized abundances of the three OTUs annotated as *F. prausnitzii* (OTU IDs 851865, 350121, and 25215) were summed for each individual sample.



### Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale prima dello svezzamento

Un subset è stato creato includendo solo i campioni collezionati il giorno dello svezzamento di ciascun gruppo e la diversità  $\alpha$  è risultata significativamente più elevata nel gruppo W42 rispetto agli altri tre gruppi. Lo stesso trend è stato registrato per la ricchezza microbica, riportando una differenza anche tra il W14 e W28. La diversità  $\beta$  si differenziava tra il gruppo



W42 ed i gruppi W14 e W21. Sono stati descritte 165 OTU DA tra i quattro gruppi. Le OTU appartenevano ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e ai generi *Bacteroides*, *Ruminococcus* e *Prevotella*.

#### *Effetto dell'età dello svezzamento sulla diversità e sulla composizione del microbiota fecale a 7 giorni post-svezzamento*

Confrontando i campioni collezionati 7 giorni post-svezzamento di ogni gruppo sperimentale, non vi era alcuna differenza nella diversità  $\alpha$  e nella ricchezza microbica. La diversità  $\beta$  era significativamente più elevata nel gruppo W14 rispetto agli altri tre gruppi ed il gruppo W42 presentava una diversità  $\beta$  più bassa rispetto agli altri, e dunque una maggiore omogeneità tra i campioni. Abbiamo descritto 165 OTU DA che appartenevano principalmente ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e ai generi *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Bacteroides* e *Oscillospira*.

#### *Effetto dell'età di svezzamento sulla diversità e composizione del microbiota fecale a 60 giorni di età*

Prendendo in considerazione il campionamento effettuato all'età di 60 giorni, la diversità  $\alpha$  è risultata significativamente diversa tra i gruppi W21 e W42 ( $p < 0,05$ ) mentre la ricchezza e la diversità  $\beta$  non variavano in base all'età di svezzamento. Allo stesso modo, l'analisi NMDS non ha riscontrato differenze tra i gruppi di svezzamento. Sono state descritte 54 OTU DA appartenenti ai phyla *Firmicutes*, *Bacteroidetes* e *Proteobacteria* e, per la maggior parte, ai generi *Prevotella*, *Ruminococcus* e *Bacteroides*.

## **DISCUSSIONE E CONCLUSIONI**

Il presente lavoro presenta il primo confronto della composizione del microbiota fecale in suinetti svezzati a diverse età, da 14 giorni (svezzamento molto precoce) a 42 giorni (svezzamento tardivo). Abbiamo caratterizzato la diversità e la composizione del microbiota da poco prima dello svezzamento fino ai 60 giorni di età dei suinetti dimostrando che i suinetti svezzati tardivamente hanno il tempo di sviluppare un ecosistema batterico ricco di batteri potenzialmente benefici come *F. prausnitzii*, prima di affrontare lo stress dello svezzamento.

Nel nostro studio, le OTU riferibili a *F. prausnitzii* erano presenti in tutti i gruppi, indipendentemente dall'età allo svezzamento, ed erano significativamente più abbondanti nel post-svezzamento, quando il microbiota intestinale si diversifica e matura (Mach *et al.*, 2015). The composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth). L'abbondanza delle OTU annotate come *F. prausnitzii* ha seguito lo stesso andamento registrato per la diversità  $\alpha$  e la ricchezza della composizione del microbiota fecale. Il gruppo W14 ha mostrato la più bassa abbondanza di *F. prausnitzii* in tutti i time point, mentre nei gruppi W28 e W42 abbiamo descritto una maggiore abbondanza nel post-svezzamento. Al contrario dei gruppi W21 e W28, il gruppo W42 risultava essere caratterizzato da una maggior abbondanza di *F. prausnitzii* anche prima dello svezzamento. *F. prausnitzii* è considerato uno dei *next generation probiotic* (NGP) più promettenti nell'uomo. La sua presenza è stata correlata ad una migliore salute intestinale, risultando particolarmente efficace come adiuvante nel trattamento di patologie a carattere infiammatorio (Sokol *et al.*, 2008). Inoltre, *F. prausnitzii* è stato proposto come indicatore della salute intestinale umana (Miquel *et al.*, 2013), una sua minor abbondanza è stata infatti correlata a patologie e disturbi derivanti dalla disbiosi intestinale (Lopez-Siles *et al.*, 2018; Martín *et al.*, 2017; Miquel *et al.*, 2013). Complessivamente, i risultati ottenuti concordano con l'ipotesi che i suinetti potrebbero trarre beneficio dall'aumentata abbondanza di *F. prausnitzii* nel microbiota intestinale prima dello svezzamento, in quanto potrebbe



fornire protezione contro la disbiosi post-svezzamento e aiutare a mantenere uno stato di omeostasi intestinale. Per confermare in via definitiva questa ipotesi, sarà necessario condurre ulteriori studi coinvolgendo un maggior numero di animali e tenendo in considerazione le normali condizioni ambientali degli allevamenti intensivi.

È stato generalmente dimostrato che la diversità e la ricchezza del microbiota intestinale sono positivamente correlate alla salute dell'intestino. Nell'uomo e nei suini, infatti, le malattie enteriche sono spesso associate a una minore ricchezza batterica (Dou *et al.*, 2017; Lozupone *et al.*, 2013) immune system development and long-lasting health. Hence, early microbiota composition is a promising predictive biomarker for health and disease but still remains poorly characterized in regards to susceptibility to diarrhoea. In the present study, we aimed to assess if gut bacterial community diversity and composition during the suckling period were associated with differences in susceptibility of pigs to post-weaning diarrhoea. Twenty piglets from 5 sows (4 piglets / litter. Rispetto ai suinetti svezzati a 14 giorni, gli animali degli altri gruppi sperimentali hanno mostrato una maggiore diversità  $\alpha$  prima dello svezzamento. Tale diversità potrebbe aiutare a proteggere ulteriormente l'omeostasi intestinale dallo stress dello svezzamento. La diversità  $\beta$  era la più bassa nel gruppo W42 prima dello svezzamento, dopo lo svezzamento e a 60 giorni di età, indicando che i suinetti di questo gruppo avevano un microbiota intestinale più omogeneo anche prima dello svezzamento. I nostri risultati confermano i risultati di studi precedenti che hanno confrontato il microbiota intestinale dei suinetti prima e dopo lo svezzamento (Mach *et al.*, 2015; Schokker *et al.*, 2014) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth. In particolare, abbiamo anche osservato che i phyla *Bacteroidetes* e *Firmicutes* erano dominanti nel microbiota fecale dei suini svezzati. Questi due taxa rappresentavano oltre il 90% di tutte le sequenze ottenute, dato confermato da studi precedenti che esaminavano il microbiota ileale, cecale e fecale di suini svezzati (Mach *et al.*, 2015; McCormack *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth. Nei suinetti, il microbiota intestinale si diversifica dopo lo svezzamento e viene stabilito un nuovo equilibrio dell'ecosistema di microbiota basato su comunità microbiche stabili (Thompson *et al.*, 2008) diet and the developmental changes of the host. Denaturing gradient gel electrophoresis was used to follow the individual community dynamics of 24 piglets over the period of 3-36 days after birth. The community of piglets older than 31 days was inferred to show high stability relative to the first 28 days post birth. The stable day 36 community showed significant correlation between cohabiting piglets, but not between siblings. This cohabitation effect was not observable in 1- or 2-week-old piglets but was strongest at either 3 or 4 weeks post birth. The onset of this change after 2 weeks is predicted to be after the development of key induction elements of the immune system and before significant levels of piglet sIgA were observable (4 weeks. I nostri risultati hanno confermato che il microbiota fecale dei suinetti si modifica prima e dopo lo svezzamento, e questo è in accordo con studi presenti in bibliografia, che dimostrano come lo svezzamento sia associato a cambiamenti drastici nel microbiota intestinale e vada ad esercitare un impatto massivo sull'intero ecosistema intestinale (Dou *et al.*, 2017; Mach *et al.*, 2015) the composition and dynamics of faecal microbiomes were studied for 31 healthy piglets across five age strata (days 14, 36, 48, 60 and 70 after birth.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che la salute dell'intestino dei suinetti potrebbe essere migliorata dallo svezzamento tardivo, poiché il microbiota intestinale avrebbe più tempo per la arricchirsi di comunità microbiche e diversificarsi prima

dello svezzamento. L'introduzione dello svezzamento tardivo nella normale pratica dell'allevamento intensivo, ad oggi, potrebbe risultare complessa poiché gli allevamenti di suini sono strutturati per svezzare gli animali a 21 o 28 giorni di età. Tuttavia, potrebbe essere possibile simulare i benefici dello svezzamento tardivo utilizzando strategie nutrizionali e/o probiotici per aumentare la diversità microbica prima dello svezzamento. Infatti, i nostri risultati indicano che *F. prausnitzii* potrebbe rappresentare un probiotico adatto alla prevenzione dei problemi di salute legati a disbiosi intestinale ed alla conseguente perdita economica associata a una riduzione della crescita nella fase di svezzamento. Inoltre, i nostri risultati sottolineano che i suinetti svezzati possono rappresentare un modello adatto allo studio di *F. prausnitzii* e di come questo influenzi la salute intestinale dell'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bøe, K., 1991. The process of weaning in pigs: when the sow decides. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 30, 47–59.
2. Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2012. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:10.1038/nmeth.2276
3. Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–6. doi:10.1038/nmeth.f.303
4. Casey, T.A., Bosworth, B.T., 2009. Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine. *Vet Diagn Invest* 21, 25–30.
5. Colson, V., Martin, E., Orgeur, P., Prunier, A., 2012. Influence of housing and social changes on growth, behaviour and cortisol in piglets at weaning. *Physiol. Behav.* 107, 59–64. doi:10.1016/j.physbeh.2012.06.001
6. Davis, M.E., Sears, S.C., Apple, J.K., Maxwell, C. V, Johnson, Z.B., 2006. Effect of weaning age and commingling after the nursery phase of pigs in a wean-to-finish facility on growth, and humoral and behavioral indicators of well-being. *J. Anim. Sci.* 84, 743–756.
7. Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huerou-Luron, I.L.E., Abdennebi-Najar, L., 2017. Characterisation of Early-Life Fecal Microbiota in Susceptible and Healthy Pigs to Post- Weaning Diarrhoea. *PLoS One* 12, 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0169851
8. Godon, J., Zumstein, E., Dabert, P., Habouzit, R.I.C., Biotechnologie, L. De, Environnement, D., National, I., Recherche, D., 1997. Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis 63, 2802–2813.
9. Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., Van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* doi:10.1016/j.tim.2017.05.004
10. Jensen, P., Recén, B., 1989. When to wean - Observations from Free-Ranging Domestic Pigs 23, 49–60. doi:https://doi.org/10.1016/0168-1591(89)90006-3

11. Lallés, J.-P., Bosi, P., Smidt, H., Stokes, C.R., 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proc. Nutr. Soc.* (2007), 66, 260–268. doi:10.1017/S0029665107005484
12. Lopez-Siles, M., Enrich-Capó, N., Aldeguer, X., Sabat-Mir, M., Duncan, S.H., Garcia-Gil, L.J., Martinez-Medina, M., 2018. Alterations in the Abundance and Co-occurrence of *Akkermansia muciniphila* and *Faecalibacterium prausnitzii* in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease Subjects. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00281
13. Lozupone, C.A., Stombaugh, J.I., Gordon, J.I., Jansson, J.K., Knight, R., 2013. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* 489, 220–230. doi:10.1038/nature11550.Diversity
14. Mach, N., Berri, M., Estelle, J., Levenez, F., Lemonnier, G., Denis, C., Leplat, J.-J., Chevalayre, C., Billon, Y., Dore, J., Rogel-Gaillard, C., Lepage, P., 2015. Early-life establishment of the swine gut microbiome and impact on host phenotypes. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 554–569. doi:10.1111/1758-2229.12285
15. Martín, R., Miquel, S., Benevides, L., Bridonneau, C., Robert, V., Hudault, S., Chain, F., Berteau, O., Azevedo, V., Chatel, J.M., Sokol, H., Bermúdez-Humarán, L.G., Thomas, M., Langella, P., 2017. Functional Characterization of Novel *Faecalibacterium prausnitzii* Strains Isolated from Healthy Volunteers: A Step Forward in the Use of *F. prausnitzii* as a Next-Generation Probiotic Isolation of Novel Extremely Oxygen. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01226
16. Massacci, F.R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jardet, D., Rossignol, M.N., Mercat, M.J., Doré, J., Lepage, P., Rogel-Gaillard, C., Estellé, J., 2020. Late weaning is associated with increased microbial diversity and *Faecalibacterium prausnitzii* abundance in the fecal microbiota of piglets. *Anim. Microbiome* 2, 1–12.
17. McCormack, U.M., Curiao, T., Buzoianu, S.G., Prieto, M.L., Ryan, T., Varley, P., Crispie, F., Magowan, E., Metzler-Zebeli, B.U., Berry, D., O’Sullivan, O., Cotter, P.D., Gardiner, G.E., Lawlor, P.G., 2017. Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* doi:10.1128/AEM.00380-17
18. McMurdie, P.J., Holmes, S., 2013. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217.
19. Miquel, S., Martín, R., Rossi, O., Bermúdez-Humarán, L.G., Chatel, J.M., Sokol, H., Thomas, M., Wells, J.M., Langella, P., 2013. *Faecalibacterium prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.* 16, 255–261. doi:10.1016/j.mib.2013.06.003
20. Oksanen, J., 2015. Multivariate analysis of ecological communities in R: vegan tutorial. *R Doc.* 1–43. doi:10.1016/0169-5347(88)90124-3
21. Paulson, J.N., Stine, O.C., Bravo, H.C., Pop, M., 2013. Differential abundance analysis for microbial marker-gene surveys. *Nat. Methods.*
22. Rideout, J.R., He, Y., Navas-Molina, J.A., Walters, W.A., Ursell, L.K., Gibbons, S.M., Chase, J., McDonald, D., Gonzalez, A., Robbins-Pianka, A., Clemente, J.C., Gilbert, J.A., Huse, S.M., Zhou, H.-W., Knight, R., Caporaso, J.G., 2014. Subsampled open-reference clustering creates consistent, comprehensive OTU definitions and scales to billions of sequences. *PeerJ* 2, e545. doi:10.7717/peerj.545
23. Schokker, D., Zhang, J., Zhang, L.L., Vastenhouw, S.A., Heilig, H.G.H.J., Smidt, H., Rebel, J.M.J., Smits, M.A., 2014. Early-life environmental variation affects intestinal microbiota and immune development in new-born piglets. *PLoS One* 9. doi:10.1371/journal.pone.0100040
24. Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humarán, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J., Corthier, G., Grangette, C.,

- Vasquez, N., Pochart, PhilippePochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P., Langella, P., 2008. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients ' ne 105.
25. TeamCore, 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria.
  26. Thompson, C.L., Wang, B., Holmes, A.J., 2008. The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *ISME J.* 2, 739–748. doi:10.1038/ismej.2008.29
  27. Yang, Q., Huang, X., Zhao, S., Sun, W., Yan, Z., Wang, P., Li, S., Huang, W., Zhang, S., Liu, L., Gun, S., 2017. Structure and Function of the Fecal Microbiota in Diarrheic Neonatal Piglets. *Front. Microbiol.* 8, 502. doi:10.3389/fmicb.2017.00502

# METODI ALTERNATIVI PER IL RILIEVO DELLA TEMPERATURA CORPOREA DEI SUINI

## ALTERNATIVE METHODS TO MEASURE BODY TEMPERATURE IN PIGS

ODINTSOV VAINTRUB M.,<sup>1</sup> HATTAB J.,<sup>2</sup> DI GIUSEPPE P.,<sup>1</sup> TRACHTMAN A.R.,<sup>2</sup>  
GABRIELLI L.,<sup>3</sup> MARRUCHELLA G.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Regrowth srls, Teramo, Italia; <sup>2</sup>Facoltà di Medicina Veterinaria di Teramo, Italia;

<sup>3</sup>Medico Veterinario, Offida, Ascoli Piceno, Italia

**Parole chiave:** temperatura corporea, temperatura orale, temperatura rettale

**Key words:** body temperature, oral temperature, rectal temperature

### RIASSUNTO

In medicina veterinaria, il rilievo della temperatura rettale è universalmente accettato come “gold standard” per determinare la temperatura corporea. Tuttavia, la sua misurazione è spesso troppo indaginosa nella pratica quotidiana. Nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecnologie per facilitare il rilievo della temperatura nell'uomo e negli animali. Lo studio qui presentato illustra i primi risultati, da ritenersi del tutto preliminari, ottenuti sviluppando un sensore per il rilievo della temperatura nel suino o mediante termometria a raggi infrarossi. L'esperienza qui maturata ci porta a ritenere che la termometria a raggi infrarossi, per quanto rapida e a basso costo, non risponda adeguatamente alle esigenze. Più promettente, invece, la misurazione della temperatura orale, che ha mostrato valori di correlazione maggiori rispetto al *gold standard* (temperatura rettale). Sinteticamente, riteniamo che i punti di forza di questo approccio possano essere così riassunti: il termometro orale potrebbe essere lasciato a disposizione dei suini, annullando l'impiego specifico di forza lavoro, è piuttosto economico e ben tollerato dai suini. Per contro, il tempo necessario affinché la temperatura orale venga misurata in modo adeguato è troppo lungo e rende auspicabile l'uso di sonde termiche più sensibili.

### ABSTRACT

In veterinary medicine, rectal temperature is widely accepted as the gold standard to determine the body temperature. However, measuring rectal temperature is often too challenging and time-consuming in farm animals. During the last few decades, new technologies have been developed to easier and more efficiently measure the body temperature in humans and animals. The present study aims to evaluate the reliability of oral and skin temperature, measured by means of an ad hoc tool or infrared thermometer, respectively. Such values were finally compared with rectal temperatures, as the gold standard. Overall, we consider that infrared thermometry, although fast and cheap, is largely unsuitable for this purpose. On the other hand, the measurement of oral temperature sounds more promising. Oral thermometer could be freely available for pigs, thus eliminating the staff commitment. In addition, it is rather cheap and welcomed by pigs. Actually, the time spent to properly measure oral temperature is still too long, making desirable the use of more sensitive probes.

## INTRODUZIONE

Tutti i mammiferi, suino incluso, sono animali omeotermi, capaci cioè di mantenere la temperatura corporea (TC) entro *range* piuttosto costanti di normalità. La TC è soggetta a variazioni fisiologiche interspecifiche, come pure durante la giornata, in funzione dell'età, a seguito di intensa attività fisica, durante la digestione etc. In condizioni patologiche, i valori della TC possono discostarsi dal *range* fisiologico, in eccesso (ipertermia, febbre) o in difetto (ipotermia). In particolare, la febbre rappresenta uno dei segni sistemici più caratteristici della flogosi, di grande utilità nella pratica clinica quotidiana (Frati, 2005), come recentemente sperimentato nel corso dell'emergenza pandemica COVID-19.

In medicina veterinaria, il rilievo della temperatura rettale (TR) è universalmente accettato come “*gold standard*” per determinare la TC. Allo scopo, si possono impiegare i classici termometri a mercurio, oppure dispositivi elettronici dotati di una “sonda” da inserire nel retto (Radostis et al., 2004).

La determinazione della TR è relativamente semplice dal punto di vista tecnico, ma spesso troppo indaginosa nella pratica suiatrica quotidiana. La necessità di individuare il singolo animale, il suo contenimento ed il tempo necessario per la misurazione della temperatura con i dispositivi attualmente disponibili fanno sì che il rilievo della TR richieda 3-10 min/capo. A ciò si aggiunga una certa variabilità legata alle dimensioni dell'animale, al numero di suini da esaminare, alla struttura aziendale e alle competenze tecniche degli operatori (Suli et al., 2017). Pertanto, la misurazione della TR come test di screening di massa è difficilmente praticabile, soprattutto in alcune fasi produttive.

Nel corso degli ultimi anni sono state sviluppate nuove tecnologie per facilitare il rilievo della TC nell'uomo e negli animali: termocamere e termometri a raggi infrarossi, microchip iniettabili tipo “*wearable*” (Jia et al., 2020). Chung et al. (2010) hanno usato con apparente successo termometri a raggi infrarossi (TRI) nei suinetti, sebbene solo attraverso misurazioni multiple ed applicando formule matematiche complesse.

Nell'uomo, è prassi diffusa il rilievo della temperatura orale (TO), fortemente correlata alla TR. Ovviamente, tale pratica non è applicabile in ambito veterinario. Tuttavia, le nuove tecnologie “sensoristiche” offrono interessanti prospettive in questa direzione, sfruttando l'istinto naturale dei suini ad esplorare con la bocca nuovi oggetti.

Lo studio qui presentato illustra i primi risultati, da ritenersi del tutto preliminari, ottenuti sviluppando un sensore per il rilievo della TO nel suino o mediante TRI; i dati ottenuti sono stati messi a confronto con la TR e sottoposti ad analisi statistica.

## MATERIALI E METODI

- *Misurazione della temperatura orale*

È stato sviluppato un termometro *ad hoc* costituito da un astuccio esterno (costruito con tecniche di stampa 3D in polimero) abbinato a componenti in gomma adattate per lo scopo. L'unità sensoriale è costituita da una piccola sonda termica di forma cilindrica, un'unità miniaturizzata per l'elaborazione dati (modulo esp32) con trasmissione Wi-Fi e una batteria. La struttura finale del termometro e la sua applicazione sono riportate in Figura 1 (a,b). La programmazione del dispositivo è stata effettuata utilizzando il linguaggio C++, tramite l'*Integrated Development Environment Arduino*. La presentazione dei dati in tempo reale è stata assegnata ad un *webserver* locale dedicato. L'unità è stata programmata per fornire una misurazione ogni 3 sec, aggiornando automaticamente la pagina *web*. Inoltre, tramite l'aggiornamento manuale della pagina è stato possibile effettuare una misurazione immediata della TO. Un *display* semplificato (Figura 1c) riporta i dati in gradi *Celsius*



e *Fahrenheit*, senza registrare i dati o creare una banca dati (*User Interface* o UI).

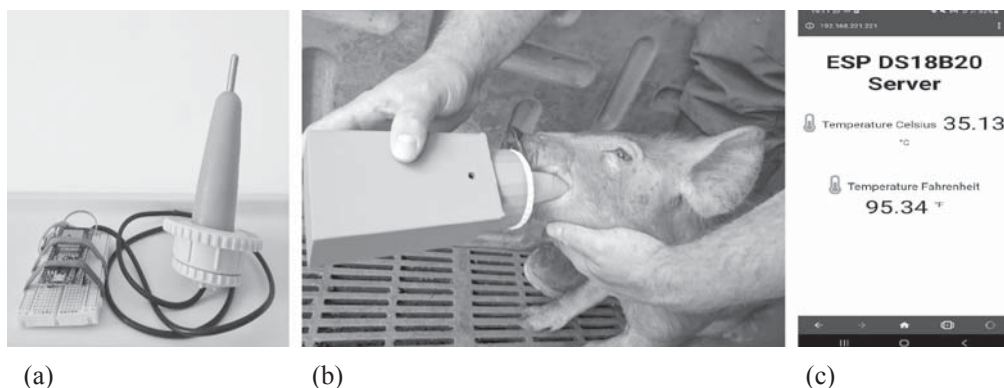
In totale, sono stati inclusi oggetto di studio 15 suini di 8 settimane di età, stabulati in un box “semi-aperto” ed esaminati nell’arco di un paio d’ore durante una sola mattinata. Ciascun soggetto è stato identificato e contenuto per il rilievo simultaneo della TO e della TR. A quest’ultimo scopo, è stato utilizzato un termometro elettronico disponibile in commercio (modello GIMA °C), che rileva la TR entro 30 sec la comunica a intervalli di tempo fissi.

- *Misurazione della temperatura corporea mediante termometro a raggi infrarossi*

In questo caso, sono stati oggetto di indagine 15 suinetti appena svezzati, stabulati *indoor*. Ciascun soggetto è stato identificato singolarmente e la sua temperatura rilevata per 5 giorni consecutivi mediante un TRI disponibile in commercio (marca “yuwell”) e comunemente utilizzato nell’uomo. Ciascun suinetto è stato contenuto e la TC rilevata in diverse aree del corpo, potenzialmente accessibili senza bisogno di catturare l’animale: groppa, spalla, fossa retroauricolare. Simultaneamente, è stata misurata la TR (vedi sopra).

- *Analisi statistica dei dati*

L’analisi statistica descrittiva è stata condotta con il software STATA. Per ogni singolo suino, è stata valutata la correlazione (“*r*” coefficiente di *Pearson*) e fra TO e TR, fra le diverse temperature misurate con TRI, e fra queste ultime e la TR.



**Figura 1. Componenti tecnici del termometro orale:** (a) sensore e unità di elaborazione; (b) rilievo della temperatura orale; (c) *display* semplificata dell’UI come riportato su dispositivo Android in modalità *wireless*.

**Figure 1. Components of the oral thermometer:** (a) sensor and processing unit; (b) survey of the oral temperature; (c) simplified display of the UI as reported on an Android device in wireless mode.

## RISULTATI

I dati di seguito riportati sono contenuti in Tabella 1.

- *Misurazione della temperatura orale*

La correlazione fra TO e TR incrementa progressivamente con l’aumentare del tempo di rilevamento, dimostrandosi bassissima se la TO viene misurata per <10 sec ( $r = 0.068$ ), maggiore dopo 20 sec ( $r = 0.77$ ) e decisamente più elevata dopo 30 sec ( $r = 0.85$ ). La correlazione fra TR e la media delle TO rilevate è risultata intermedia ( $r = 0.74$ ).



- *Misurazione della temperatura corporea mediante termometro a raggi infrarossi*  
La misurazione della TC mediante TRI ha richiesto pochissimi secondi, ma ha mostrato una correlazione costantemente medio-bassa rispetto alla TR ( $0.41 < r < 0.59$ ).

**Tabella 1.** Quadro riassuntivo della correlazione fra le temperature corporee dei suini misurate mediante termometro rettale, orale ed a raggi infrarossi

**Table 1.** Pearson's coefficient between oral, skin and rectal temperatures

|                                              | Tempo necessario per la rilevazione della temperatura | Correlazione con la temperatura rettale (coefficiente <i>r</i> di Pearson) |
|----------------------------------------------|-------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Temperatura orale</b>                     |                                                       |                                                                            |
| Prima misurazione                            | 10 sec                                                | 0.06                                                                       |
| Seconda misurazione                          | 20 sec                                                | 0.77                                                                       |
| Terza misurazione                            | 30 sec                                                | 0.85                                                                       |
| Media delle misurazioni                      | 30 sec                                                | 0.74                                                                       |
| <b>Temperatura corporea misurata con TRI</b> |                                                       |                                                                            |
| Groppa                                       | 1-5 sec                                               | 0.41                                                                       |
| Spalla                                       | 1-5 sec                                               | 0.37                                                                       |
| Fossa retroauricolare                        | 1-5 sec                                               | 0.59                                                                       |

## DISCUSSIONE

Il progresso tecnologico sta fornendo una serie di strumenti utili per una gestione “precisa” delle produzioni animali (“*precision livestock farming*”), a livello individuale e collettivo. Ciò risponde a specifiche esigenze, non solo prettamente zootecniche ma anche sanitarie, etiche e di puro “*marketing*”, sulla spinta della crescente sensibilità del consumatore nei confronti delle problematiche connesse all'allevamento intensivo del bestiame (benessere animale, uso razionale degli antimicrobici, sostenibilità ambientale etc.). Riteniamo che il nostro studio trovi piena collocazione in questo ambito, nel tentativo di fornire un'informazione sanitaria fondamentale, in tempo reale, su ogni singolo animale ed in modo economicamente vantaggioso.

L'esperienza qui maturata ci porta a ritenere che la termometria a raggi infrarossi, per quanto rapida ed a basso costo, non risponda adeguatamente alle esigenze. Di fatto, la temperatura corporea misurata con TRI si è dimostrata poco correlata al *gold standard* (TR), anche in quelle aree della cute dove le setole sono meno rappresentate (vedi fossa retroauricolare). Più promettente la misurazione della TO, che ha mostrato valori di correlazione maggiori.

## CONCLUSIONI

Sinteticamente, riteniamo che i punti di forza e di debolezza della termometria orale possano essere così riassunti: (a) il termometro orale potrebbe essere lasciato a disposizione dei suini, annullando l'impiego specifico di forza lavoro; (b) sebbene trattasi di un prototipo, il costo del termometro orale è stato piuttosto contenuto (circa 50 euro), il che lo rende potenzialmente collocabile in più aree dell'allevamento; (c) i suini interagiscono volentieri con il termometro orale, che vedono di fatto come una sorta di arricchimento ambientale; (d) il tempo per una adeguata misurazione della TO risulta essere troppo lungo, il che rende auspicabile l'utilizzo di sonde termiche più sensibili in modo da velocizzare il processo di rilievo dati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Chung T.H., Jung W.S., Nam E.H., Kim J.H., Park S.H., Hwang C.Y. (2010) "Comparison of rectal and infrared thermometry for obtaining body temperature of gnotobiotic piglets in conventional portable germ-free facility". *Asian Australas J Anim Sci* 23, 1364-1368.
2. Frati L. (2005) "Fisiopatologia della termoregolazione: ipertermie e febbre" in: Pontieri G.M., Russo M.A., Frati L. "Patologia generale" vol. 2, 3a ed., Piccin, 879-889.
3. Jia G.F., Li W., Meng J.Y., Tan H.Q., Feng Y.Z. (2020) "Non-contact evaluation of pigs' body temperature incorporating environmental factors". *Sensors* 20, 15.
4. Radostis O.M., Mayhew I.G., Houston D.M. (2004) "Clinica medica e diagnostica veterinaria", Antonio Delfino Editore.
5. Suli T., Halas M., Benyeda Z., Boda R., Belak S., Martinez-Aviles M., Fernandez-Carrion E., Sanchez-Vizcaino J.K.M. (2017) "Body temperature and motion: Evaluation of an online monitoring system in pigs challenged with porcine reproductive & respiratory syndrome virus". *Res Vet Sci* 114, 482-488.



# **ANEMIA FERROPRIVA DEL SUINETTO: PROBLEMA RISOLTO O NASCOSTO? INDAGINE SUL TASSO EMOGLOBINICO DEI SUINI ALLO SVEZZAMENTO E SULL'EFFICACIA DELLE DIVERSE TIPOLOGIE DI FERRO INIETTABILE**

## **IRON DEFICIENCY ANEMIA IN PIGLETS: PROBLEM SOLVED OR HIDDEN? SURVEY ON HAEMOGLOBIN LEVEL OF PIGS AT WEANING AND EFFICACY OF DIFFERENT TYPES OF INJECTABLE IRON**

PILERI E., COMINOTTI F., CASAPPA P.

*Ceva Salute Animale*

**Parole chiave:** Anemia ferropriva, Gleptoferrone, Emoglobina.

**Keywords:** Iron deficiency anemia, Gleptoferron, Haemoglobin.

### **RIASSUNTO**

L'anemia ferropriva del suinetto (IDA) è una condizione patologica di grande importanza per la produzione suinicola poiché determina un ridotto accrescimento degli animali ed una riduzione delle loro capacità immunitarie. Per determinare l'incidenza dell'IDA negli allevamenti italiani e valutare l'efficacia delle diverse tipologie di Fe come misura di trattamento preventiva, sono stati coinvolti 10 allevamenti suinicoli ed è stato misurato il livello di emoglobina (Hb) nel sangue di 281 suinetti (età media 23 giorni). Entro il 5° giorno di vita, 150 animali sono stati trattati con un nuovo prodotto a base di Gleptoferrone+Toltrazuril (Ceva Salute Animale, prodotto A) e 230 con una preparazione a base di Fe destrano (prodotti B, C, D, E). Il valore di Hb medio complessivo è risultato pari a 10,67 [10,52; 10,81] g/dl, con un 13% di suinetti in condizioni di anemia conclamata (Hb < 9 g/dl) ed un 45% in condizioni di sub-anemia (Hb = 9-11 g/dl). I suinetti trattati col prodotto A avevano un valore Hb medio di 11,3 [11,1; 11,5] g/dl, statisticamente superiore a quelli trattati con i diversi prodotti a base di Ferro destrano (10,3 [10,1; 10,4] g/dl). La percentuale di suinetti anemici era del 20% e 1% per gli animali trattati con Fe destrano ed il prodotto A, rispettivamente. In conclusione, l'IDA è un problema ancora presente nell'allevamento suinicolo italiano e l'uso preventivo del prodotto associato Gleptoferrone+Toltrazuril ha un'efficacia superiore rispetto ai prodotti attualmente in commercio a base di Fe destrano.

### **ABSTRACT**

Iron Deficiency anemia (IDA) is a pathological condition of a great importance for pig production since it causes a reduced growth performance and an impairment of the swine immune system. In order to determine the IDA' incidence in Italian farms and to evaluate the efficacy of different types of Fe supplementation, 10 farms were involved in the study and the hemoglobin (Hb) level of 281 piglets was measured (average age 23 days). By the 5th day of life, 150 animals had been treated with a new product based on Gleptoferrone+Toltrazuril (Ceva Animal Health, product A) whereas 230 piglets received a preparation based on Fe dextran (products B, C, D, E). The overall average Hb value was 10.67 [10.52; 10.81] g/dl, with 13% of anemic piglets (Hb <9 g/dl) and 45% of sub-anemic animals (Hb = 9-11 g/dl). The piglets treated with product A had an average Hb value of 11.3 [11.1; 11.5] g/dl, statistically higher than those treated with the

Iron dextran-based products (10.3 [10.1; 10.4] g/dl). The percentage of anemic piglets was 20% and 1 % for animals treated with Fe dextran and product A, respectively. In conclusion, IDA is a problem still present in the Italian pig farms and the preventive use of the associated product Gleptoferrone+Toltrazuril showed an higher efficacy than competitors products based on Fe dextran.

## INTRODUZIONE

L'anemia ferropriva del suinetto (IDA, dall'inglese Iron deficiency anemia) è una problematica oggi probabilmente sottovalutata ma di grande importanza per la produzione suinicola. I cambiamenti delle condizioni di management ed il miglioramento genetico degli ultimi anni, hanno portato infatti ad un aumento delle dimensioni delle covate e ad una maggiore velocità di accrescimento degli animali, ragion per cui è necessario rivalutare l'efficacia delle strategie di prevenzione dell'IDA.

I suinetti nascono con riserve di Ferro (Fe) molto limitate e necessitano di un apporto giornaliero di circa 7-10 mg di Fe, senza il quale sviluppano un'anemia ferropriva già 10-14 giorni dopo la nascita (Venn and McCance, 1947). Lo sviluppo di IDA, conclamata o latente, si traduce in un ridotto accrescimento degli animali in svezzamento (Dunshea et al., 2003; Bhattarai and Nielsen, 2015; Perri et al., 2015) ed in una ridotta capacità immunitaria (De Wayne et al., 1977; De Sousa et al., 1988; Brock, 1994; Svoboda et al., 2004). Perri et al., (2015) dimostrarono ad esempio che i suinetti anemici al momento dello svezzamento pesavano 0,82 Kg in meno rispetto a quelli normali. In modo analogo, Bhattarai et al., (2015) dimostrarono che un incremento di 10 g di Hb/l di sangue nelle prime tre settimane post-svezzamento si traduceva in un aumento dell'accrescimento medio giornaliero pari a 17,2 g/die. Parallelamente, Svoboda et al., 2004 hanno dimostrato una riduzione di plasmacellule e macrofagi circolanti, nonché della funzionalità di questi ultimi nei soggetti affetti da IDA. Questo comporta una maggiore suscettibilità dei suini verso alcune patologie batteriche, come ad esempio la diarrea indotta da *Escherichia coli* (De Wayne et al., 1977; Daykin et al., 1982). Diversi autori hanno inoltre dimostrato una significativa riduzione dell'immunità cellulare nei suinetti anemici (De Sousa et al., 1988; Brock, 1994).

Per tutte queste ragioni è fondamentale assicurarsi che l'apporto giornaliero di Fe sia sufficiente ad evitare l'apparizione dell'IDA. Poiché il latte materno copre solo una piccola parte del fabbisogno di Fe, per prevenire lo sviluppo di anemia è prassi somministrare del Fe per via orale o parenterale ai lattonzoli di pochi giorni d'età. Per quanto riguarda la supplementazione di Fe per via intramuscolare (IM), esistono attualmente diversi prodotti commerciali. Tra le preparazioni più diffuse si trovano quelle a base di Fe destrano, un complesso ad alto peso molecolare che viene captato dalle cellule del sistema reticoloendoteliale nel sito d'iniezione. Una volta nei fagociti, il Fe viene liberato per mezzo degli enzimi lisosomiali e viene poi immagazzinato in forma di ferritina (Svoboda et al., 2017). Un'altra sostanza per la supplementazione IM del Fe è il Gleptoferrone, una soluzione colloidale di Ossi-idrossido di Fe ed Acido Glucoeptonico destrano. Il metabolismo di questo composto è simile a quello del Fe destrano e negli studi comparativi realizzati sinora, ambo i tipi di preparazione sono risultati efficaci nella prevenzione dell'IDA (Pollmann et al., 1983; Vermeer et al., 2002). Molto recentemente, un nuovo prodotto iniettabile costituito da una combinazione di Gleptoferrone e Toltrazuril è stato immesso in commercio da Ceva Salute Animale per la prevenzione dell'IDA e della coccidiosi del suinetto. Dalle indagini realizzate in 7 Paesi Europei su un totale di 2.100 suinetti tra i 21 e 25 giorni d'età, è emerso che solo il 52% dei suinetti presentava dei livelli di Hb ottimali mentre il restante 36% e 12% di suini

si trovava rispettivamente in uno stato di sub-anemia e anemia conclamata (dati interni Ceva Salute Animale). Di fronte a tali dati sorge l'ipotesi che la prevenzione dell'anemia ferropriva sia oggi un problema poco percepito ma attuale più che mai. L'obiettivo principale del presente studio è stato quindi quello di determinare l'incidenza dell'IDA su un campione di aziende Italiane e di valutare se l'efficacia della prevenzione dell'anemia è influenzata, tra gli altri fattori, dalla tipologia di Fe iniettabile utilizzato.

## **MATERIALI E METODI**

Nella presente indagine sono stati coinvolti 10 allevamenti commerciali, quattro a ciclo chiuso e sei a ciclo aperto (dimensioni da 200 a 4000 scrofe). Per ogni azienda sono stati selezionati, in media, 38 lattonzoli (3 per nidiata) provenienti da oltre 12 scrofe (media sul totale aziende, 12,6 scrofe) con un ordine di parto compreso tra il primo e il settimo. A tutti i suinetti di età compresa tra 3-5 è stato somministrato, seguendo le istruzioni del produttore, un prodotto commerciale iniettabile per la prevenzione dell'anemia ferropriva. Dei 381 suini analizzati in totale, 150 sono stati trattati con una combinazione iniettabile di Gleptoferrone (200 mg di Fe) + Toltrazuril (Ceva Salute Animale, prodotto A), mentre i restanti 231 suinetti sono stati trattati con un prodotto a base di Ferro Destrano (200 mg di Fe) (prodotti B, C, D o E). Nelle aziende 1, 2, 3 e 4, parallelamente al ferro destrano storicamente in uso, è stato testato anche il prodotto A per una prova comparativa diretta. Poiché l'80-90% del ferro presente nei lattonzoli è utilizzato per la formazione dell'Hb, la misurazione di quest'ultima consente di valutare la quantità di Fe nei suinetti e di conseguenza l'eventuale presenza di IDA. Nel presente studio, il tasso emoglobinico dei suinetti in prossimità dello svezzamento (età media 23 giorni) è stato determinato in allevamento mediante il dispositivo Hemocue®. Il livello di emoglobina (Hb) medio (espresso in g/dl di sangue) ed i corrispondenti intervalli di confidenza al 95% (CI95%) sono stati calcolati per tutta la popolazione in studio, per tipologia di prodotto e per azienda. Inoltre, secondo Bhattarai e Nielsen (2015), i suinetti sono stati classificati in 3 categorie: 1) non anemici (Hb > 11 g/dl), 2) sub-anemici (Hb compresa tra 9 e 11 g/dl) e, 3) anemici (Hb < 9 g/dl). La percentuale di animali appartenenti ad ognuna delle categorie è stata calcolata sia per la popolazione totale che per le singole aziende e tipologie di prodotti. Per finire, i suinetti trattati con la combinazione Gleptoferrone+Toltrazuril sono stati comparati con quelli trattati con ferro destrano per quanto riguarda la concentrazione media dell'Hb e la % di animali anemici, sub-anemici e normali. Il livello di significatività statistica è stato fissato a 0,05.

## **RISULTATI**

Il valore di Hb medio per tutta la popolazione in studio era pari a  $10,67 \pm 1,45$  [10,52; 10,81] g/dl, con un 12,9% (49/381) di suinetti in condizioni di anemia conclamata (Hb < 9 g/dl) ed un 44,9% (171/381) in condizioni di sub-anemia (Hb tra 9 e 11 g/dl). Nella tabella 1 si mostrano i valori medi di Hb così come la percentuale di suinetti per categoria di Hb, per ogni azienda e prodotto utilizzato.

**Tabella 1.** Valori medi dell'Hb con corrispondenti CI95%, Coefficiente di Variazione (CV) e percentuale di individui nelle categorie di Hb, per ogni azienda e prodotto a base di Fe. "p" rappresenta la significatività statistica.

**Table 1.** Average Hb values plus corresponding CI95%, Coefficient of Variation (CV) and percentage of individuals in the Hb categories, for each farm and Iron product. "p" represents statistical significance.

| AZIENDA | PRODOTTO            | N° SUINI | Hb MEDIO [CI95%] g/dl | CV (%) | p     | Hb< 9 g/dl (%) | Hb= 9-11 g/dl (%) | Hb> 11 g/dl (%) |
|---------|---------------------|----------|-----------------------|--------|-------|----------------|-------------------|-----------------|
| 1       | A                   | 15       | 11,1 [10,8; 11,4]     | 7,1    | >0,05 | 0,0            | 53,3              | 46,7            |
|         | B                   | 30       | 10,7 [10,3; 11,1]     | 10,4   |       | 10,0           | 53,3              | 36,7            |
| 2       | A                   | 30       | 11,0 [10,7; 11,4]     | 8,9    | >0,05 | 3,3            | 46,7              | 50              |
|         | C                   | 30       | 10,7 [10,2; 11,2]     | 13,2   |       | 13,3           | 40,0              | 46,7            |
| 3       | A                   | 30       | 11,2 [10,8; 11,7]     | 11,7   | <0,05 | 3,3            | 36,7              | 60,0            |
|         | C                   | 30       | 8,8 [8,3; 9,4]        | 17,5   |       | 56,7           | 36,6              | 6,7             |
| 4       | A                   | 15       | 11,9 [11,3; 12,4]     | 13,8   | <0,05 | 0,0            | 33,3              | 66,7            |
|         | D                   | 15       | 9,4 [9,1; 9,7]        | 9,1    |       | 40,0           | 60,0              | 0,0             |
| 5       | A                   | 30       | 11,7 [11,4; 12,0]     | 7,3    | NA    | 0,0            | 33,3              | 66,7            |
| 6       | A                   | 30       | 11,1 [10,8; 11,5]     | 9,7    | NA    | 0,0            | 46,7              | 53,3            |
| 7       | B                   | 30       | 10,6 [10,0; 11,3]     | 16,5   | NA    | 16,7           | 36,7              | 46,7            |
| 8       | C                   | 30       | 10,7 [10,2; 11,1]     | 12,6   | NA    | 10,0           | 50,0              | 40,0            |
| 9       | C                   | 27       | 9,6 [9,3; 9,9]        | 8,8    | NA    | 22,2           | 74,1              | 3,7             |
| 10      | E                   | 30       | 10,7 [10,3; 11,2]     | 11,1   | NA    | 10,0           | 40,0              | 50,0            |
| Totale  | A (glepto.+toltra.) | 150      | 11,3 [11,1; 11,5]     | 10,0   | <0,05 | 1,3            | 41,3              | 57,4            |
|         | Fe destrano         | 231      | 10,3 [10,1; 10,4]     | 14,5   |       | 20,3           | 47,2              | 32,5            |

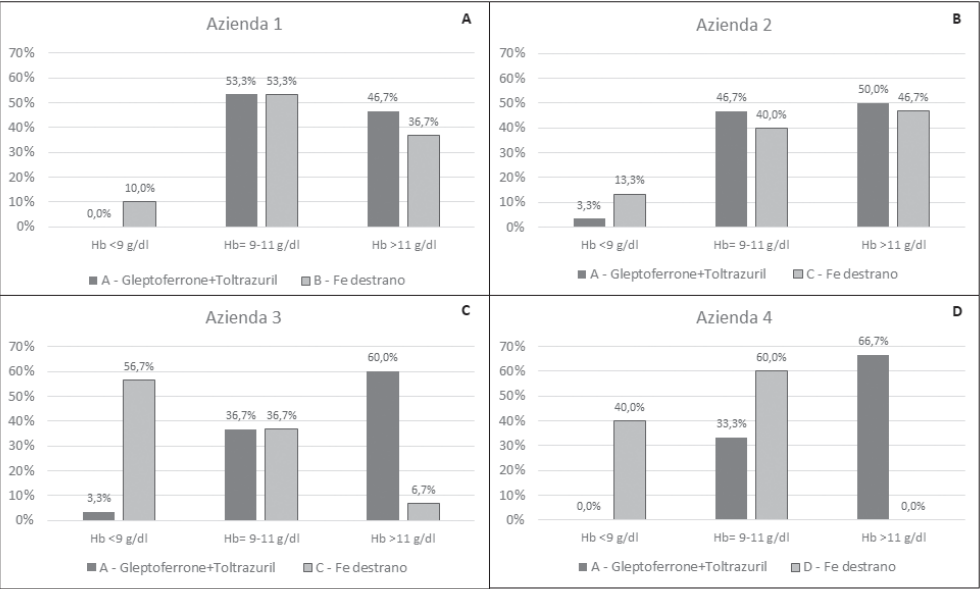
Nelle prove comparative realizzate nelle aziende 1 e 2 non si osservano differenze statisticamente significative tra il livello medio di Hb dei suini trattati col prodotto A e quelli trattati con i prodotti B e C. Ciò nonostante, la percentuale di suinetti con anemia conclamata era pari al 10,0% e 13,3% per i prodotti B e C rispettivamente, mentre era pari a zero e al 3,3% nei suini trattati con la combinazione Gleptoferrone+Toltrazuril (aziende 1 e 2, rispettivamente). Nell'azienda 3, il valore medio di Hb era di 11,2 [10,8; 11,7] g/dl per il prodotto A vs. 8,8 [8,3; 9,4] g/dl per il prodotto C (differenza statisticamente significativa). Inoltre, il 56,7% di suinetti trattati col Ferro destrano C presentavano anemia conclamata rispetto al 3,3% dei suinetti trattati col prodotto A. Un simile scenario si osserva anche nell'azienda 4 dove il tasso medio di Hb era di 11,9 [11,3; 12,4] g/dl e 9,4 [9,1; 9,7] g/dl per i suini trattati col prodotto A e D rispettivamente ( $p<0,05$ ). Nel gruppo trattato con la combinazione Gleptoferrone+Toltrazuril non erano presenti suinetti anemici mentre il 40,0% dei suini trattati col Ferro destrano D era in stato di anemia conclamata. La figura 1 mostra la percentuale di suinetti anemici, sub-anemici e normali per ogni tipologia di ferro iniettabile nelle aziende 1, 2, 3 e 4.

Per quanto riguarda le aziende 5 e 6 (prodotto A), la quantità di suinetti anemici era pari a zero. Nelle aziende 7, 8, 9 e 10, i suinetti trattati con prodotti a base di ferro destrano risultano anemici nel 16,7%, 10,0%, 22,2% e 10,0% dei casi, rispettivamente.



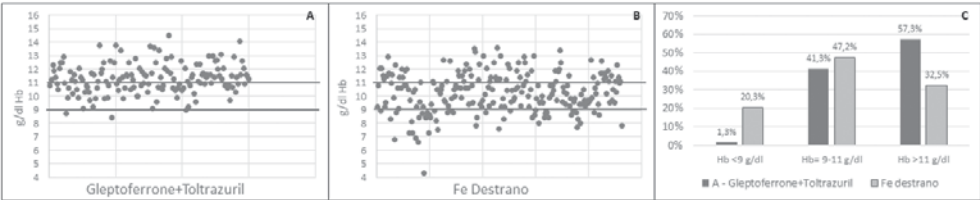
**Figura 1.** Percentuale di suinetti normali (Hb >11 g/dl), sub-anemici (Hb compresa tra 9 e 11 g/dl) ed anemici (Hb < 9 g/dl) per trattamento, nelle aziende 1 (riquadro A), 2 (riquadro B), 3 (riquadro C) e 4 (riquadro D).

**Figure 1.** Percentage of not anemics ((Hb >11 g/dl), sub-anemics (Hb between 9 and 11 g/dl) and anemics (Hb < 9 g/dl) piglets with different iron treatments, in farm 1 (panel A), 2 (panel B), 3 (panel C) and 4 (panel D)



**Figura 2.** Distribuzione dei valori di Hb dei singoli suinetti trattati con la combinazione Gleptoferrone+Toltrazuril (riquadro A) e con i vari prodotti a base di Fe destrano (riquadro B). Le linee viola parallele marcavano i limiti di 11 g/dl e 9 g/dl di Hb, al di sotto dei quali compaiono i suinetti sub-anemici ed anemici, rispettivamente. Nel riquadro C si mostra la percentuale di individui per ogni categoria di Hb.

**Figure 2.** Distribution of Hb values of individual piglets treated with the combination of Gleptoferron+Toltrazuril (panel A) and other products based on dextran Iron (panel B). The purple lines remark the thresholds of 11 g/dl and 9 g/dl di Hb, below of which piglets are sub-anemics and anemics, respectively. In panel C, the percentage of individuals for each category of Hb is shown.



## DISCUSSIONE

L'anemia ferropriva del suinetto è una problematica conosciuta da moltissimo tempo la cui prevenzione consiste nella somministrazione di preparazioni a base di Fe poco dopo la nascita. Ciò nonostante, i cambiamenti delle pratiche di allevamento e la predominanza

di linee genetiche a rapido accrescimento, potrebbero aver portato negli ultimi anni ad un incremento dei fabbisogni nutrizionali del suinetto e ad un aumento non manifesto dei casi di IDA. L'obiettivo del presente studio era quindi quello di verificare lo status emoglobinico dei suinetti prossimi allo svezzamento e, in secondo luogo, di valutare se l'efficacia nella prevenzione dell'anemia ferropriva poteva dipendere, tra gli altri fattori, dalla tipologia di Fe iniettabile utilizzato.

Dai risultati dell'indagine condotta su 381 suinetti prossimi allo svezzamento, è emerso che il 13% degli animali era in condizione di anemia conclamata ed il 45% era in stato sub-anemico. Tali dati coincidono con quanto osservato nel resto d'Europa dove il 36% e 12% di suini erano sub-anemici e anemici (dati interni Ceva Salute Animale), e confermano che l'IDA è un problema presente nella produzione suinicola Italiana ed Europea.

Mentre non è stato possibile dimostrare una correlazione tra la genetica, la dimensione delle nidi e i livelli emoglobinici dei suinetti (dati non presentati), dal presente studio è emerso che il tasso medio di Hb nel sangue è influenzato, tra gli altri fattori, dalla tipologia di Fe somministrato. In contrasto con quanto osservato da Pollmann et al., (1983) e Vermeer et al., (2002), il tasso emoglobinico medio era significativamente superiore negli animali trattati con la combinazione di Gleptoferrone+Toltrazuril (prodotto A, Ceva Salute Animale; n=150) rispetto a quelli che hanno ricevuto una dose di Fe destrano (prodotti B, C, D ed E; n=231). Inoltre, la percentuale di suinetti anemici nel gruppo trattato con Fe destrano era pari al 20% mentre solo l'1% di animali trattati con la combinazione Gleptoferrone+Toltrazuril era in stato di anemia conclamata. Differenze statisticamente significative sono emerse anche nelle prove comparative realizzate nelle aziende 3 e 4, sia per quanto riguarda il livello di Hb che per la percentuale di suinetti anemici e sub-anemici, essendo queste ultime sempre superiori negli animali trattati con Fe destrano. Anche nelle altre aziende, la proporzione di suini con IDA o sub-anemici è risultata nettamente superiore negli animali trattati con Fe destrano rispetto a quelli trattati col Gleptoferrone+Toltrazuril.

## CONCLUSIONE

L'IDA è un problema ancora presente nell'allevamento suinicolo italiano e bisognerebbe prestare maggiore attenzione alla sua diagnosi ed al miglioramento delle strategie di prevenzione. La supplementazione con il gleptoferrone, ed in particolare l'uso del prodotto associato Gleptoferrone+Toltrazuril, ha dimostrato di essere un valido strumento per la prevenzione dell'IDA e di avere un'efficacia superiore rispetto ai prodotti concorrenti a base di Fe destrano.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bhattarai, S., and Nielsen, J.P., 2015. Association between hematological status at weaning and weight gain post-weaning in piglets. *Livest. Sci.* 182, 64-68.
2. Brock, J.H., 1994. Iron in infection, immunity, inflammation and neoplasia. In: Brock, J.H., Halliday, J.W., Pippard, M.J., Powell, L.W. (Eds.), *Iron Metabolism in Health and Disease*. W.B. Saunders, London, pp. 354-389.
3. Daykin, M.M., Griffiths, A.J., Towler, R.G., 1982. Evaluation of the parenteral iron requirement of early weaned piglets. *Vet. Rec.* 110, 535-537.
4. De Sousa, M., Breedvelt, F., Dynesius-Trentham, R.D., Trentham, D., Lum, J., 1988. Iron, iron-binding proteins and immune system cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 256, 310-322.
5. De Wayne, A., Boyd, B., Hal, H., 1997. A new prophylactic approach to reduction of piglet mortality. *Med. Vet. Pract.* 58, 509-515.

6. Dunshea, F.R., Kerton, D.K., Cranwell, P.D., Campbell, R.G., Mullan, B.P., King, R.H., Power, G.N., Pliske, J.R., 2003. Lifetime and post-weaning determinants of performance indices of pigs. *Aust. J. Agric. Res.* 54, 363-370.
7. Perri, A.M., Friendship, R.M., Harding, J.C.S., O'Sullivan, T.L., 2015. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on post-weaning performance. *J. Swine Health Prod.* 24(1), 10-20.
8. Pollmann, D.S., Smith, J.E., Stevenson, J.S., Schoneweis, D.A., Hines, R.H., 1983. Comparison of gleptoferron with iron dextran for anaemia prevention in young pigs. *J. Anim. Sci.* 56, 640-644.
9. Svoboda, M., Vanhara, J., Berlinska, J., 2017. Parental iron administration in suckling piglets – a review. *Acta. Vet. Brno.* 86, 249-261.
10. Venn, J.A.J., McCance, R.A., Widdowson, E.M., 1947. Iron metabolism in piglet anemia. *J. Comp. Pat.* 57, 314-325.
11. Vermeer, J.E., Kuijpers, A.H., Elbers, A.R., 2002. Comparison of the efficacy of two different iron supplements for anemia prevention in piglets. *Tijdschr. Diergeneesk.* 127, 101-104.



**INDAGINE SULLE LESIONI SUGGESTIVE DI POLMONITE  
ENZOOTICA E PLEUROPOLMONITE NEI SUINI PESANTI  
AL MACELLO, ATTRAVERSO LA METODOLOGIA DEL  
“CEVA LUNG PROGRAM”: IMPATTO DELLO SCHEMA  
VACCINALE VERSO MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE E  
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE**

***SURVEY OF ENZOOTIC PNEUMONIA (EP)-LIKE AND  
PLEUROPNEUMONIA (APP)-LIKE LESIONS IN HEAVY  
PIGS AT SLAUGHTERHOUSE USING THE CEVA LUNG  
PROGRAM METHODOLOGY: IMPACT OF THE VACCINATION  
SCHEDULE AGAINST MYCOPLASMA HYOPNEUMONIAE AND  
ACTINOBACILLUS PLEUROPNEUMONIAE***

PILERI E., COMINOTTI F., CASAPPA, P., ROSINA S.

*Ceva Salute Animale*

**Parole chiave:** Lesioni polmonari, Macello, Vaccinazione.

**Key words:** Lung lesions, Slaughterhouse, Vaccination.

**RIASSUNTO**

*Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) e *Actinobacillus Pleuropneumoniae* (App) sono agenti primari del complesso della malattia respiratoria del suino. La prevalenza e gravità delle lesioni indotte da tali patogeni e l'impatto di diversi schemi vaccinali verso M.hyo e App sono stati esaminati al macello sui polmoni di 21.575 suini pesanti (da 91 aziende) usando la metodica del Ceva Lung Program (CLP). La prevalenza globale di lesioni EP- ed App-like era del 40% e 27%, rispettivamente. L'indice EP era pari a 1,117 [1,107;1,126] e quello APPI a 0,686 [0,681;0,692]. I suini vaccinati con Hyogen® (Ceva Salute Animale) (G1, n=4.815) presentavano la minore prevalenza di lesioni polmonari (38%) e cicatrici (6%). Il loro indice EP (0,998 [0,979;1,017]) era statisticamente inferiore a quello dei suini vaccinati con altri prodotti monodose (G2, n=8.782; 1,054 [1,041;1,068]), con vaccini a doppia dose (G3, n=3.799; 1,119 [1,097;1,141]) e con prodotti bivalenti (G4, n=4.197; 1,303 [1,357;1,410]). La prevalenza delle lesioni App-like era del 22% e 37% nei suini vaccinati con Coglapix® (Ceva Salute Animale, n=2.432) o altri prodotti concorrenti (n=999), rispettivamente. Gli animali vaccinati con Coglapix® presentavano inoltre un indice APPI statisticamente inferiore rispetto a quelli vaccinati con prodotti concorrenti (0,511 [0,472;0,551] vs. 0,668 [0,566;0,769]). In conclusione, il CLP si è dimostrato uno strumento estremamente utile ed affidabile per monitorare i programmi vaccinali verso M.hyo e App.

**ABSTRACT**

*Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo) and *Actinobacillus Pleuropneumoniae* (App) are primary agents of the porcine respiratory disease complex. The prevalence and severity of lesions induced by these pathogens as well as the impact of various vaccination schemes against M.hyo and App were determined at slaughterhouse on the lungs of 21,575 heavy pigs (from 91 farms) using the Ceva Lung Program (CLP) methodology. The overall prevalence of EP- and App-like lesions was 40% and 27%, respectively. The EP index was 1.117 [1.107; 1.126] and the APPI index was 0.686 [0.681; 0.692]. Pigs vaccinated with

Hyogen® (Ceva Animal Health) (G1, n = 4,815) had the lowest prevalence of lung lesions (38%) and scars (6%). Their EP index (0.998 [0.979; 1.017]) was statistically lower than that of pigs vaccinated with other one-shot products (G2, n = 8,782; 1.054 [1.041; 1.068]), with two-shots vaccines (G3, n = 3,799; 1.119 [1.097; 1.141]) and with bivalent products (G4, n = 4,197; 1.303 [1.357; 1.410]). The prevalence of App-like lesions was 22% and 37% in pigs vaccinated with Coglapix® (Ceva Animal Health, n = 2,432) or other competitor products (n = 999), respectively. Animals vaccinated with Coglapix® also showed a statistically lower APPI index than those vaccinated with competitor products (0.511 [0.472; 0.551] vs. 0.668 [0.566; 0.769], respectively). In conclusion, CLP is an extremely useful and reliable tool for monitoring vaccination programs against Mhyo and App.

## INTRODUZIONE

Il complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) rappresenta una delle problematiche di maggior rilevanza per la produzione suinicola a livello mondiale. È il risultato di una complessa interazione tra diversi fattori quali: agenti patogeni a eziologia primaria e secondaria (virus, micoplasmi e batteri), suscettibilità individuale ed immunità di popolazione, condizioni ambientali e livello di biosicurezza aziendale.

Le perdite economiche associate al PRDC sono ingenti e si devono principalmente ad una riduzione delle performances produttive, ad un incremento dei costi di medicazione e, in alcuni casi, ad un incremento della mortalità. Per quanto riguarda *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hyo), uno degli agenti primari del PRDC, si stima che la perdita funzionale del 10% di parenchima polmonare possa portare ad una riduzione del 17% dell'incremento ponderale giornaliero (-37 g/die) e ad un incremento del 14% della conversione alimentare (Meyns et al., 2011). Analogamente, diversi autori hanno riscontrato una chiara associazione tra le lesioni pleuriche dorso-caudali al macello (suggestive di infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae*, App) ed una ridotta performance produttiva dei suini (Pagot et al., 2007; Menys et al., 2011). Per esempio, Menys et al., (2011) hanno stimato una riduzione del 34% dell'accrescimento ponderale giornaliero per ogni 10% di parenchima polmonare colpito da lesioni suggestive di App, mentre Rohrbach (1993), in un'azienda con infezione subclinica da App, ha descritto un prolungamento di 5,64 giorni del periodo necessario per raggiungere il peso di macellazione.

Uno dei sistemi più frequentemente utilizzati per la sorveglianza della malattia respiratoria nel suino è quello delle punteggiature polmonari al macello. Esso consente di stimare l'incidenza e gravità delle pleuriti dorso-caudali, denominate anche "App-like lesions," delle broncopolmoniti cranio-ventrali, denominate anche "enzootic pneumonia (EP) -like lesions" e delle cicatrici come risultato di lesioni precoci EP-like pneumonia regredite. La valutazione delle lesioni pleuriche e polmonari al macello, consente quindi di ottenere informazioni oggettive sullo stato sanitario della popolazione in studio e permette inoltre di monitorare l'efficacia delle misure di controllo in atto verso i principali patogeni respiratori.

Per tali motivi, gli obiettivi del presente studio erano: 1) determinare la prevalenza e gravità delle lesioni EP- ed App-like in un campione di suini pesanti italiani al macello e, 2) valutare l'impatto dei principali programmi vaccinali verso M.hyo e App.

## MATERIALI E METODI

Dal settembre del 2017 alla fine del 2018, è stata realizzata un'indagine sulle lesioni polmonari di suini pesanti al macello (>160 Kg pv) che ha coinvolto 91 aziende italiane con differenti dimensioni e sistemi produttivi. In tutti gli allevamenti i suinetti venivano

vaccinati di routine contro M.hyo usando diversi prodotti commerciali mentre solo 20 aziende (il 16% del totale) vaccinavano anche contro App. Per ogni allevamento sono stati analizzati, in media, i polmoni di 2 partite di 121 suini ciascuno, per un totale di 178 punteggiature e 21.575 polmoni analizzati (Tab.1). Le punteggiature polmonari al macello sono state eseguite usando la metodologia del “Ceva Lung Program” (Ceva Salute Animale), basata sulla metodica sviluppata da Dottori et al., (2007), Ostanello et al., (2007) e Merialdi et al., (2008). Su ogni lotto di animali e su tutta la popolazione in esame sono state quindi calcolate: 1) la prevalenza delle lesioni EP-like, App-like e delle cicatrici polmonari; 2) l’indice EP medio con i corrispondenti Intervalli di Confidenza al 95% (CI95%) e 3) l’indice APPI medio con i corrispondenti CI95%.

**Tabella 1.** Dati descrittivi della popolazione in esame e dei gruppi di suini per la comparazione tra protocolli vaccinali verso M.hyo.

**Table 1.** Descriptive data of the examined population and swine groups used for the comparison of vaccination schedules against M.hyo.

|                                      | <b>G1</b> |          | <b>G2</b>   | <b>G3</b> | <b>G4</b> | <b>TOTALE</b> |
|--------------------------------------|-----------|----------|-------------|-----------|-----------|---------------|
| <b>Tipologia di vaccino M.hyo</b>    | Hyogen    | Monodose | Doppia dose | Bivalente |           |               |
| <b>Numero Aziende</b>                | 15        | 40       | 28          | 12        |           | <b>91</b>     |
| <b>Numero Partite</b>                | 34        | 75       | 35          | 34        |           | <b>178</b>    |
| <b>Numero Suini</b>                  | 4.815     | 8.782    | 3.799       | 4.179     |           | <b>21.575</b> |
| <b>Num. medio di suini/partita</b>   | 141,62    | 117,09   | 108,54      | 122,91    |           | <b>121,21</b> |
| <b>Num. medio di partite/azienda</b> | 2,27      | 1,88     | 1,25        | 2,83      |           | <b>1,96</b>   |

Per valutare l’efficacia degli schemi vaccinali in uso contro M.hyo, i suini delle varie aziende sono stati raggruppati in 4 categorie: 1) G1: suini vaccinati con una dose singola di Hyogen (Ceva Salute Animale) a 3 settimane di età (n= 4.815); 2) G2: animali vaccinati con un altro prodotto commerciale monodose (n=8.782) applicato di solito entro la terza settimana d’età; 3) G3: suini vaccinati con un prodotto commerciale in doppia dose (n=3.799), la prima somministrata generalmente nella prima settimana di vita e la seconda 3-4 settimane più tardi e, 4) G4: animali vaccinati con un’unica dose di un prodotto commerciale bivalente (Mhyo +PCV2) (n=4197) (Tab. 1). Nel caso della valutazione dell’efficacia della vaccinazione verso App, gli individui sono stati invece raggruppati nel seguente modo: 1) C1: suini vaccinati con Coglapix (Ceva Salute Animale) alle 7 e 10 settimane d’età (n=2.432), 2) C2: animali vaccinati con un prodotto concorrente (n=999) e 3) C3: suini non vaccinati (n=18.144)

Per ogni categoria di animali sono stati calcolati la prevalenza delle lesioni EP o App-like e delle cicatrici così come gli indici EP ad APPI medio con i corrispondenti CI95%. Per la comparazione di questi parametri tra i diversi schemi vaccinali, il livello di significatività statistica è stato fissato a 0,05.

## RISULTATI

Su 21.575 polmoni totali analizzati, il 40,27% mostrava lesioni riconducibili alla EP e l’8,78% presentava cicatrici polmonari. L’indice EP medio della popolazione in studio era pari a 1,117 [1,107; 1,126]. La prevalenza di pleuriti dorso-caudali ascrivibili ad App era pari al 27,83% e l’indice APPI medio era di 0,686 [0,681; 0,692].



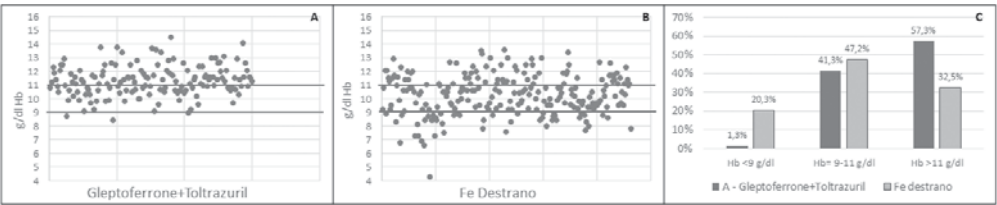
**Tabella 2.** Indici EP e prevalenza di lesioni EP-like e cicatrici nelle varie categorie di suini.  
**Table 2.** EP indexes and prevalence of EP-like lesions and scars for the different categories of pigs.

|                      | G1                      | G2                      | G3                      | G4                      | TOTALE                  |
|----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| EP Index [95% CI]    | 0,998<br>[0,979; 1,017] | 1,054<br>[1,041; 1,068] | 1,119<br>[1,097; 1,141] | 1,303<br>[1,357; 1,410] | 1,117<br>[1,107; 1,126] |
| Scar scores [95% CI] | 0,062<br>[0,060; 0,064] | 0,098<br>[0,096; 0,100] | 0,103<br>[0,100; 0,107] | 0,082<br>[0,079; 0,085] | 0,088<br>[0,087; 0,089] |

Nella tabella 2 si riassumono i risultati ottenuti nell’analisi comparativa tra G1 e le diverse tipologie di prodotti concorrenti. La prevalenza delle lesioni EP-like era pari al 38,13% per il gruppo vaccinato con Hyogen, mentre era pari al 40,54%, 40,56% e 41,92% nei suini di G2, G3 e G4, rispettivamente. La percentuale di polmoni con presenza di cicatrici era del 6,19% nel G1 vs. il 9,83%, del G2, il 10,32% del G3 e l’8,18% del G4 (Fig. 1). Per quanto riguarda il valore medio dell’indice EP, le differenze tra i vari gruppi erano tutte statisticamente significative ( $p<0,05$ ), essendo i suini vaccinati con Hyogen quelli con l’indice minore (0,998 [0,979; 1,017]) (Fig. 2). L’indice EP medio dei suini vaccinati con prodotti concorrenti era pari a 1,054 [1,041; 1,068] nel G2, 1,119 [1,097; 1,141] nel G3 e 1,303 [1,357; 1,410] nel G4. I suini vaccinati con Hyogen avevano un punteggio medio attribuito alle cicatrici polmonari di 0,062 [0,060; 0,064]. Tale valore era statisticamente inferiore rispetto agli altri vaccini monodose (G2, 0,098 [0,096; 0,100]), a quelli a doppia dose (G3, 0,103 [0,100; 0,107] ed ai bivalenti (G4, 0,082 [0,079; 0,085] (Fig. 2).

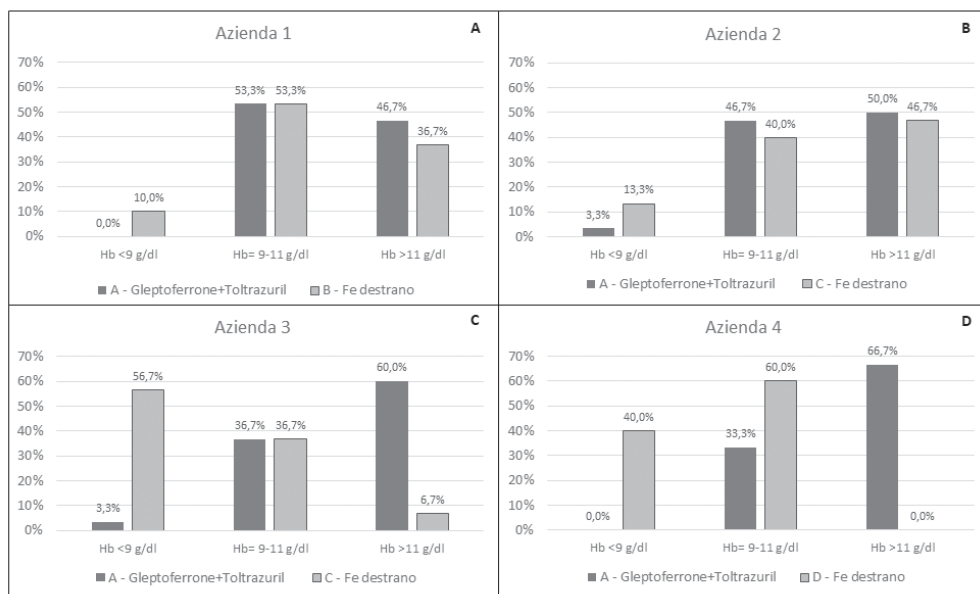
**Figura 1.** Prevalenza delle lesioni EP-like (riquadro A) e delle cicatrici polmonari (riquadro B) nelle diverse categorie di suini.

**Figure 1.** Prevalence of EP-like lesions (panel A) and lung scars (panel B) for the different categories of pigs.



**Figura 2.** Indice EP medio ( riquadro A) e punteggio medio delle cicatrici ( riquadro B) nelle diverse categorie di suini. I trattini orizzontali (azzurri) rappresentano la media mentre le linee verticali rappresentano gli Intervalli di Confidenza al 95%. Le lettere minuscole indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ).

**Figure 2.** Average EP index (banel A) and average scars score (panel B) in the different categories of pigs. The horizontal dashes (blue) represent the average while the vertical lines represent the 95% Confidence Intervals. Different lowercase letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).



La prevalenza di pleuriti dorso-caudali riconducibili ad App era del 22,00% nei suini vaccinati con Coglapix (C1), del 37,14% negli animali del gruppo C2 e del 28,22% negli animali non vaccinati verso App (C3). L'indice APPI aveva un valore medio di 0,511 [0,472; 0,551] nei suini vaccinati con Coglapix, essendo tale valore statisticamente inferiore a quello degli animali vaccinati con prodotti concorrenti (C2, 0,668 [0,566; 0,769]) e non vaccinati per App (C3, 0,782 [0,766; 0,782]). Non è stato possibile evidenziare delle differenze statisticamente significative dell'indice APPI tra il gruppo C2 e gli animali non vaccinati del C3, probabilmente a causa del minor numero di polmoni analizzati nel C2.

## DISCUSSIONE

Il complesso della malattia respiratoria del suino (PRDC) causa ingenti perdite economiche nella produzione suinicola mondiale in quanto determina una riduzione delle performances produttive, un incremento dei costi di medicazione e, in alcuni casi, un incremento della mortalità. M.hyo ed App si considerano patogeni primari del PRDC ed il monitoraggio delle lesioni EP- ed App-like al macello, consente una valutazione oggettiva della patologia respiratoria del suino e dell'efficacia delle corrispondenti misure di controllo.

Con l'obiettivo di valutare la prevalenza e la gravità delle lesioni polmonari da M.hyo e App, nonché l'efficacia di diversi schemi vaccinali, i polmoni di 21.575 suini procedenti da 91 aziende, sono stati analizzati al macello usando la metodologia del "Ceva Lung Program". Dal presente studio è emerso che il 40,3% dei suini mostrava lesioni riconducibili a M.hyo

e l'8,8% presentava cicatrici polmonari. L'indice EP medio della popolazione in studio era pari a 1,117 [1,107; 1,126]. Tali valori, seppur leggermente inferiori, sono in accordo con quanto previamente descritto da Merialdi et al., (2012) e Pangallo et al., (2019). Dall'analisi comparativa dei diversi schemi vaccinali, è emerso che la prevalenza delle lesioni EP-like nei suini appartenenti ai diversi gruppi era pressoché simile. Ciononostante si è osservata una riduzione statisticamente significativa dell'indice EP dei suini vaccinati con Hyogen (0,998 [0,979; 1,017]), rispetto ai suini vaccinati con prodotti concorrenti. Tra i gruppi di animali vaccinati con altri prodotti, quelli del G2 avevano l'indice EP migliore (1,054 [1,041; 1,068]), seguiti dal G3 (1,119 [1,097; 1,141]) e G4 (1,303 [1,357; 1,410]). Il fatto che Hyogen ed i competitors monodose abbiano permesso una riduzione significativa degli indici EP rispetto ai vaccini "two-shots" è un dato particolarmente interessante per la produzione suinicola italiana dove, a causa della lunghezza del ciclo produttivo dei suini pesanti, si è sempre pensato che la vaccinazione con richiamo garantisse una migliore protezione degli animali da M.hyo.

Per quanto riguarda la prevalenza di pleuriti dorso-caudali ascrivibili ad App nella popolazione oggetto di studio, questa era pari al 27,8%, mentre l'indice APPI medio era di 0,686 [0,681; 0,692], analogamente a quanto descritto da Merialdi et al., (2012). Entrando nello specifico, la prevalenza di lesioni App-like si riduceva al 22,0% nei suini vaccinati con Coglapix mentre in quelli vaccinati con prodotti concorrenti era pari al 37,1%. Anche l'indice APPI dei suini trattati con Coglapix (0,511 [0,472; 0,551]) era statisticamente inferiore rispetto a quello del gruppo C2 (0,668 [0,566; 0,769]). Il fatto che la prevalenza delle lesioni pleuriche nel gruppo C2 fosse superiore a quella osservata negli animali non vaccinati (28,2%) e che non esistessero differenze significative tra gli indici APPI dei suini del gruppo C2 e quelli non vaccinati, potrebbe essere dovuto in parte al minor numero di animali inclusi nel gruppo. Un'altra possibile spiegazione sarebbe quella che, negli allevamenti dove si applica di routine la vaccinazione per App, la pressione infettiva e probabilmente anche la patogenicità dei ceppi presenti in azienda è talmente alta che i risultati della profilassi vaccinale sono, in proporzione limitati. Per terminare, la presenza di un 28,2% di suini non vaccinati con lesioni App-like suggerisce che le infezioni da App nelle aziende italiane sono spesso sottovalutate e di difficile diagnostico, in quanto probabilmente di natura subclinica.

## CONCLUSIONE

La metodologia del Ceva Lung Program è uno strumento utile ed oggettivo per la valutazione delle lesioni pleuriche e polmonari al macello e consente di monitorare le patologie respiratorie del suino così come l'efficacia delle misure di controllo corrispondenti. Dalla presente indagine è inoltre emerso che la vaccinazione con Hyogen e Coglapix, rispetto ai prodotti concorrenti, consente di ottenere un miglioramento significativo della prevalenza e gravità delle lesioni associate a M.hyo e App.

## BIBLIOGRAFIA

1. 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.
2. Merialdi, G., Bonilauri, P., Dottori, M., Nigrelli, A., Martelli, P., 2008. Monitoring respiratory disease at slaughterhouse using lung and pleural lesions score and serology. *Proceedings of the 20<sup>th</sup> IPVS Congress, Durban, South Africa, June 22-27, 2008. Vol. 2: p.380.*
3. Merialdi, G., Dottori M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B.,

- Martelli, P., 2012. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. *Vet J.* 193, 234-239.
4. Meyns, T., Van Steelant, J., Rolly, E., Dewulf, J., Heasebrouk, F., Maes, D. (2011). A crosssectional study of risk factors associated with pulmonary lesions in pigs at slaughter. *Vet J.* 187, 388-392.
  5. Ostanello, F., Dottori, M., Gusmara, C., Leotti, G., Sala, V., 2007. Pneumonia disease assessmaent using a slaughterhouse lung-scoring method. *J. Vet. Med.* 5, 70-75.
  6. Pagot, E., Pommier, P., Keita, A., 2007. Relationship between growth during the fattening period and lung lesions at slaughter in swine. *Revue Médecine Vétérinaire* 158, 253-259.
  7. Pangallo, G., Bonilauri, P., De Lorenzi, G., Luppi, A., Dottori, M., 2019. Polmonite enzootica: monitoraggio delle lesioni broncopolmonari in suini macellati nel periodo 2012-2018. Meeting Annuale della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS): 21-22 Marzo 2019, Rezzato.
  8. Rohrbach, B.W., 1993. Effect of subclinical infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae* in comingled feeder swine. *JAVMA*, 2 (7).



# LA MORTALITA' DEI SUINETTI PRE-SVEZZAMENTO VIENE INFLUENZATA TANTO DALLA TIPOLOGIA DI GABBIA PARTO QUANTO DAL PERIODO STAGIONALE

## PRE-WEANING PIGLETS MORTALITY DEPENDS BOTH FROM THE TYPE OF FARROWING CAGE AND THE SEASONAL PERIOD

ROMANO G.<sup>1</sup>, BRESCIANI C.<sup>2</sup>, RIGHI F.<sup>2</sup>, TAGLIAFERRI L.<sup>1</sup>, SCOLLO A.<sup>1</sup>, MAZZONI C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Swivet Research, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia, Italia

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Università di Parma, 43121 Parma, Italia

**Parole chiave:** gabbie parto, mortalità, schiacciamento, efficienza sala parto

**Key words:** farrowing cage, mortality, crushing, farrowing room efficiency

### RIASSUNTO

Nell'industria suinicola odierna, il guadagno economico della sala parto corrisponde niente meno che al numero di suinetti svezzati per scrofa per anno. Questo parametro, però, è direttamente collegato alla mortalità pre-svezzamento: una minore mortalità in lattazione si traduce, inevitabilmente, in un maggior numero di suinetti svezzati. Le cause e i fattori alla base di questo tipo di problema sono molteplici e variabili, e il loro controllo risulta essere molto complesso. Poiché la maggior parte della mortalità pre-svezzamento è causata da fenomeni di schiacciamento, risulta interessante suddividere la mortalità totale in mortalità per schiacciamento e mortalità per altre cause. Lo scopo di questo studio è stato di valutare come variano questi due tipi di mortalità in funzione a diverse tipologie di gabbie parto e al periodo stagionale, oltre a valutare il numero di suinetti svezzati per scrofa in base al tipo di gabbia parto.

### ABSTRACT

In the pig industry the economic gain of the farrowing room corresponds to the number of piglets weaned per sow per year. This parameter, is directly related to pre-weaning mortality: a lower lactation mortality means a greater number of weaned piglets. The causes and factors of the problem are multiple and variable, and their control is very complex. Since the majority of pre-weaning mortality is caused by crushing, it is interesting to divide total mortality into mortality by crushing and mortality due to other reasons. The aim of this study was to evaluate how these two types of mortality vary depending on different types of farrowing cages and the seasonal period, in addition to assessing the number of piglets weaned per sow based on type of farrowing crate.

### INTRODUZIONE

La mortalità pre-svezzamento è da sempre uno degli aspetti riproduttivi più importanti nell'industria suinicola, e la conoscenza dei fattori che la influenzano diventa fondamentale al fine di ridurre le perdite produttive, innalzare i profitti delle imprese suinicole e, ultimo ma non meno importante, migliorare il benessere animale (Muns et al., 2016). La percentuale di mortalità pre-svezzamento mondiale negli allevamenti intensivi suinicoli si aggira attorno al 10-20% (KilBride et al., 2010; Nuntapaitoon e Tummaruk, 2015), con una percentuale Europea del 12,9% (Muns e Tummaruk, 2016). In particolare, Kirkden et al. (2013) sostengono che la mortalità in lattazione è strettamente legata al livello manageriale presente

in azienda e, di solito, si aggira attorno all'11-13%, includendo un 7-8% di perdite dovute ai nati morti. In media il 50-80% dei suinetti muore durante la prima settimana post-parto, identificando i primi 3 giorni di vita come i più critici (Koketsu et al., 2006; Andersen et al., 2009).

Ormai è risaputo che lo schiacciamento rappresenta la causa principale di morte nei suinetti in lattazione, in parte, ma non solo, come diretta conseguenza del freddo e dell'inedia a cui sono sottoposti alcuni suinetti (Alonso-Spilsbury et al., 2007). Vaillancourt et al. (1990) riportano che, tra le cause di mortalità pre-svezzamento, vi sono lo schiacciamento (33,8%), la bassa vitalità (29,7%), le diarree (12,2%), le infezioni (8,1%), le malformazioni congenite (5,5%) e altre cause (10,7%), fra cui l'aggressività materna. Sono diversi i fattori alla base di questo importante problema e Muns et al. (2016) li classificano all'interno di tre grandi categorie: il suinetto, la scrofa e l'ambiente. Il fattore più importante inerente il suinetto risiede nel suo peso alla nascita (Nuntapaitoon e Tummaruk, 2015; Vaillancourt et al., 1990), problematica attualmente molto frequente a causa delle nuove genetiche iperprolifiche che determinano un aumento del numero di nati vivi, ma, contemporaneamente, ne diminuiscono il peso alla nascita (Feller, 2010). Suinetti leggeri, infatti, possiedono una minore capacità di mantenere un'adeguata temperatura corporea ed hanno minori riserve energetiche, entrambi fattori che aumentano notevolmente il rischio di morte; specialmente durante le prime ore di vita, dove la termoregolazione del suinetto risulta compromessa dall'evaporazione dei fluidi placentari, con conseguente raffreddamento del nuovo nato e instaurazione di una condizione di ipotermia (Tummaruk et al., 2017). Quest'ultima compromette la capacità del suinetto di poppare, con conseguente inedia, letargia e schiacciamento da parte della madre, che solitamente si verifica nel momento in cui essa passa da una posizione eretta ad una sdraiata, oppure da un decubito sternale ad uno laterale (Danholt et al., 2011). Anche la vitalità, se bassa, è un fattore predisponente la morte, in quanto il suinetto non riuscirà a competere per il capezzolo e incorrerà, anche in questo caso, in fenomeni di inedia e letargia (Muns et al., 2013), rischiando di essere schiacciato nel tentativo fallito di alimentarsi. Una bassa vitalità del suinetto è direttamente correlata ad una situazione di ipossia intra-parto, che di solito si manifesta negli ultimi nati in corso di parti molto lunghi, determinando diversi danni al sistema nervoso centrale del feto (Muns et al., 2016).

I fattori inerenti alla scrofa, invece, sono principalmente legati alla sua produzione di colostro, allo stress peri-parto e all'alimentazione. Il colostro gioca un ruolo importante per la termoregolazione del suinetto, lo sviluppo intestinale e l'acquisizione di un'immunità passiva (Tummaruk et al., 2017), quest'ultima essenziale per ridurre la sensibilità alle infezioni dell'immediato post-parto. Inoltre, non va sottovalutato lo stress a cui va incontro la scrofa nei giorni precedenti al parto, dovuto al processo del parto in sé ed al nuovo ambiente (gabbia parto) in cui viene trasferita. Come conseguenza di questo stress, la durata del parto tende ad allungarsi e la produzione di colostro tende a diminuire, oltre al fatto che il comportamento della scrofa potrebbe modificarsi negativamente con conseguente aggressione alla propria prole (Tummaruk et al., 2017). Inoltre, non deve essere trascurata l'alimentazione della scrofa, poiché contribuisce allo sviluppo del feto nel corso della gestazione, influenzando direttamente sia la vitalità che il peso dei suinetti alla nascita (Tummaruk et al., 2017).

Infine, anche l'ambiente gioca un ruolo importante nella mortalità pre-svezzamento. Al di là del trasferimento delle scrofe all'interno delle gabbie parto, che conduce ad una condizione di stress indotto dalla soppressione di un comportamento preparto naturale, ovvero la creazione del nido (Damm e Pedersen, 2000), anche il periodo caldo influenza negativamente le performance della scrofa, inducendo il così detto "stress da caldo" (Yuzhi et al., 2010). Lo stress, sia da trasferimento in gabbia che da caldo, riduce l'appetito e la mobilitazione delle riserve corporee della scrofa (Nardone et al., 2010), determinando di conseguenza, una



maggior perdita di lardo dorsale durante la lattazione, il che influenza sia la salute della scrofa che l'accrescimento dei suinetti (Nuntapaiboon e Tummaruk, 2017).

Sono quindi tante e diverse le variabili legate alla mortalità pre-svezzamento, e risulta davvero complicato poterle controllare tutte in ugual maniera. Dal momento che il 50-80% della mortalità totale in lattazione è causata dallo schiacciamento e dall'inedia (Jarvis et al., 2005) è opportuno concentrarsi su questi due fattori principali per ridurre la gran parte delle perdite economiche a cui va incontro l'allevatore. Anche se le gabbie parto presentano un nido artificiale riscaldato da lampade infrarossi, che permettono al suinetto di riprendersi dalla nascita, i neonati spendono comunque i primi giorni della propria vita, in particolare le prime 24 ore, attaccati alla scrofa (Danholt et al., 2011), poiché attratti da stimoli tattili, termici e olfattivi (Vasdal et al., 2010). La creazione, negli ultimi anni, di gabbie parto innovative volte a migliorare il benessere animale e a ridurre gli schiacciamenti e, di conseguenza, la mortalità pre-svezzamento (Mazzoni et al., 2018), non è da sottovalutare, così come dedicare maggiore attenzione alla sala parto, prendendosi cura dei suinetti più in difficoltà e ottimizzando la gestione manageriale (Muns e Tummaruk, 2016).

Lo scopo di questo studio è stato valutare la mortalità pre-svezzamento in base all'utilizzo di diverse tipologie di gabbie parto e in base al periodo stagionale. In particolare, è stato deciso di suddividere la mortalità totale in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa, allo scopo di identificare quale tipo di mortalità viene più o meno influenzato dal disegno della gabbia parto piuttosto che dalla stagione. Inoltre, è stata anche presa in considerazione l'efficienza totale della sala parto, ovvero il numero di suinetti svezzati per scrofa per parto (Mazzoni, 2007), come conferma che una maggiore mortalità conduce inevitabilmente ad una riduzione di questo parametro, con conseguenti perdite economiche per l'allevatore. In particolare, Mazzoni (2007) divide l'efficienza totale della sala parto in due sottocategorie: l'*efficienza della scrofa*, ovvero il numero di suinetti presenti al momento dello svezzamento, quindi effettivamente svezzati da ogni singola scrofa durante la lattazione, e l'*efficienza tecnica*, ovvero il numero dei suinetti svezzati per scrofa per parto che derivano dall'applicazione dei diversi sistemi di adozione e che sono resi possibili dal solo intervento dell'operatore.

## 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 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 sale parto è mantenuta tra i 18° ed i 23°C ed è presente un sistema di ventilazione a pressione negativa.

Lo studio è stato condotto tra gennaio e luglio 2018, per un periodo complessivo di 6 mesi, e ha visto coinvolte 213 scrofe pluripare e relative nidiate, per un totale di 3.328 suinetti. Le scrofette sono state escluse dalla prova in quanto la loro reazione al parto e il loro comportamento nel post-parto risultano imprevedibili, mancando queste di una simile esperienza pregressa. Nell'arco dei sei mesi sono stati coinvolti 5 periodi, che, per comodità, identificheremo con

numeri progressivi da 1 a 5: periodo 1 (gennaio-febbraio), periodo 2 (febbraio-marzo), periodo 3 (marzo-aprile), periodo 4 (maggio) e periodo 5 (giugno-luglio). Sono state coinvolte 5 diverse tipologie di gabbie parto, tutte già presenti all'interno dell'allevamento: gabbie convenzionali, gabbie con meccanismo "up and down", gabbie con scivolo, gabbie aperte con pavimentazione in plastica (aperta P) o in acciaio (aperta A). Per maggior chiarezza, le diverse tipologie di gabbie parto verranno descritte più nel dettaglio in seguito. La maggior parte dell'allevamento è provvisto di sale parto contenenti 10 gabbie convenzionali l'una e sono poche le sale dedicate alle altre tipologie di gabbie parto. In particolare, sono una sala per tipologia di gabbia: la sala 11A (10 gabbie con meccanismo "up and down"), 11B (8 gabbie con scivolo) e 18A (9 gabbie aperte P + 9 gabbie aperte A). La prova si è svolta all'interno delle stesse sale parto per tutto il semestre (10A, contenente 10 gabbie Convenzionali, 11A, 11B e 18A), La successione delle bande utilizzate per lo studio ha dovuto tenere conto del tempo necessario affinché il gruppo di scrofe alloggiate nelle sale parto della prova terminasse il periodo di lattazione e venisse svezzato, per poi lasciare il posto al nuovo gruppo di scrofe in ingresso nelle stesse sale parto. Quindi, pur essendo un'azienda a banda settimanale, il nostro studio non ha preso in considerazione il normale susseguirsi delle bande in allevamento, bensì acquisiva nella prova una banda ogni 25-30 giorni.

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 (effettuato entro le 24 ore dal parto) ad un numero di 14-15 suinetti per scrofa. Sulla stessa scheda sono stati anche riportati tutti gli eventi accaduti durante la lattazione, della durata di circa 25 giorni. In particolare, sono state annotate le cause di decesso dei suinetti (schiacciamento, sottopeso, scarto, diarrea, streptococco, castrazioni o ernie con esito negativo), il numero di soggetti tolti o aggiunti, poiché 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. La maggior parte di questi dati è stata raccolta per dare uno spessore maggiore all'analisi statistica, mentre i parametri fondamentali per questo studio sono rappresentati dalla mortalità totale in lattazione, che verrà poi suddivisa in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa, e il numero di svezzati per scrofa, che rappresenta una diretta conseguenza della mortalità pre-svezzamento. Nella Tabella 1 sono riassunti i principali dati relativi all'intero gruppo di studio, suddivisi per tipologia di gabbia parto.

| Parametro                 | Convenzionali | Up and down | Con scivolo | Aperte P | Aperte A |
|---------------------------|---------------|-------------|-------------|----------|----------|
| <b>Numero di scrofe</b>   | 50            | 48          | 38          | 36       | 41       |
| <b>Ordine di parto</b>    | 4° parto      | 4° parto    | 5° parto    | 4° parto | 4° parto |
| <b>Nati vivi totali</b>   | 791           | 755         | 533         | 562      | 687      |
| <b>Nati vivi/scrofa</b>   | 15,9          | 15,5        | 14          | 16,3     | 16,2     |
| <b>Nati morti/scrofa</b>  | 0,9           | 1,15        | 1,3         | 0,7      | 0,9      |
| <b>Mummificati/scrofa</b> | 0,4           | 0,4         | 0,2         | 0,4      | 0,2      |

**Tabella 1.** Valore medio dei parametri principali considerabili in una scrofa, relativi all'intero gruppo di studio e suddivisi per tipologia di gabbia parto.

**Table 1.** Mean value of the main parameters considered in a sow, relative to the whole study group, divided by type of farrowing crate.

Di seguito viene riportata la descrizione dettagliata delle tipologie di gabbie parto utilizzate durante lo studio.

### **Gabbia parto convenzionale (figura 1)**

Ciascuna gabbia parto (2700×1700 mm) contiene un'area dedicata alla scrofa (2100×600 mm), circondata da sbarre orizzontali in metallo atte a limitarne i movimenti, e una mangiatoia (0.5×1.5 m), posizionata di fronte alla scrofa stessa. Anteriormente alla scrofa è presente uno spazio nido per i suinetti, con pavimento riscaldato ad acqua ed una lampada ad infrarossi. Il pavimento della gabbia è fessurato di metallo rivestito in plastica, permettendo una facile gestione delle deiezioni. La gabbia convenzionale permette una buona ottimizzazione dello spazio all'interno delle sale parto e, attualmente, è il tipo di gabbia più in uso nell'industria suinicola.



**Figura 1.** Esempio di gabbia parto di tipo convenzionale.

*Figure 1. Example of Conventional farrowing crate.*

### **Gabbia parto con meccanismo “up and down” (figura 2)**

Ciascuna gabbia parto (2700×1700 mm) contiene un'area centrale dedicata alla scrofa (2100×630×500 mm), provvista di barre orizzontali in metallo, paragonabili a quelle delle gabbie convenzionali, sempre volte a limitarne i movimenti; tutto intorno è presente lo spazio dedicato ai suinetti, inclusa la presenza del nido riscaldato con pavimento pieno e lampade ad infrarossi. Questa tipologia di gabbia parto prende il nome di “up and down” in quanto provvista di un sensore meccanico che si attiva quando la scrofa passa da una posizione sdraiata ad una eretta, innescando un meccanismo che prevede l'innalzamento dell'area della scrofa di 20 cm sopra al livello del terreno. Ciò consente ai suinetti di rimanere ad un livello inferiore rispetto alla madre quando questa si alza in piedi, senza avere possibilità alcuna di raggiungerla. Al contrario, quando la scrofa decide di coricarsi il sensore meccanico non rileva più la sua presenza e determina quindi un abbassamento dell'area della scrofa per tornare allo stesso livello del terreno. A questo punto, la scrofa sarà già sdraiata, quindi in una posizione sicura per i suinetti che si avvicineranno alla madre per la poppata. La gabbia parto con meccanismo “up and down” è una tipologia di gabbia innovativa, con un costo superiore alla convenzionale, che prevede ancora il totale contenimento della scrofa, ma si pone come obbiettivo primario la riduzione della mortalità in lattazione.



**Figura 2.** Esempio di gabbia parto con meccanismo “up and down”. È possibile vedere il sensore meccanico (giallo) che attiva il meccanismo di innalzamento e abbassamento dell’area della scrofa.

***Figure 2.** Example of “up and down” designed farrowing crate. It is possible to see the mechanical sensor (yellow) which activates the mechanism for raising and lowering the sow’s area..*

### **Gabbia parto con scivolo (figura 3)**

Ciascuna gabbia parto (2600×1800 mm) contiene un’area dedicata alla scrofa (1810×585 mm) e un nido in acciaio (400×500 mm) posizionato dietro e di lato alla scrofa, ad un livello più basso rispetto alla pavimentazione della gabbia. Al momento del parto, i suinetti vengono espulsi direttamente su un piano inclinato (scivolo) situato dietro al posteriore della scrofa, che si collega direttamente al nido in acciaio; quest’ultimo viene riscaldato da una lampada infrarossi e risulta essere provvisto di strisce in carta, al fine di accogliere in maniera confortevole i nuovi nati. Due scalini posti su un lato del nido, permetteranno ai suinetti, dopo essersi asciugati e riscaldati, di risalire a livello della scrofa e raggiungere le mammelle. Anche la gabbia parto con scivolo è una tipologia di gabbia innovativa, con un costo superiore alla convenzionale ma inferiore alla “up and down”, e prevede anch’essa il totale contenimento della scrofa, con lo scopo principale di ridurre la mortalità appena dopo il parto.





**Figura 3.** Esempio di gabbia parto con scivolo. È possibile vedere lo scivolo dietro al posteriore della scrofa e il nido in acciaio, provvisto di carta, a cui questo è collegato.

**Figure 3.** Example of slide cage. It is possible to see the slide behind the back of the sow and the steel nest, provided with paper, to which this is connected.

#### **Gabbia parto aperta con pavimentazione in plastica o in acciaio (figura 4)**

Questa tipologia di gabbia parto, in quanto dimensioni e conformazione, è molto simile alla gabbia convenzionale, ma presenta la peculiarità che l'area dedicata alla scrofa può essere aperta e regolata di ampiezza a seconda delle necessità. Il perimetro intorno alla scrofa rimane dedicato ai suinetti, anche se in parte viene condiviso con la madre nel momento in cui la sua area viene allargata. È comunque presente un nido, sempre fornito di lampada ad infrarossi e tappetino riscaldato o non, il cui accesso è riservato esclusivamente ai suinetti, mentre la pavimentazione dell'intera gabbia può essere in plastica o in acciaio. Esistono diversi modelli di gabbie parto aperte, ma quelle presenti all'interno dell'allevamento oggetto dello studio prevedono che entrambi i divisori della gabbia possano essere sganciati nella parte posteriore e fissati alle pareti del box. Inoltre, la gabbia all'interno dei box può essere disposta in senso longitudinale o in senso diagonale, come nel nostro caso. Le gabbie aperte prendono anche il nome di “Free Farrowing Systems”, in quanto sono tipologie di gabbie volte a garantire la parziale o totale libertà della scrofa durante la lattazione. Solitamente l'apertura dei divisori avviene dopo 3 giorni dal parto, in modo da lasciare il tempo sia alla madre che ai suinetti di socializzare in sicurezza.



**Figura 4.** Esempio di gabbia parto aperta con pavimentazione in plastica. Sulla destra è possibile vedere il nido.

**Figure 4.** Example of open farrowing cage with plastic flooring. On the right it is possible to see the nest.

#### *Analisi statistica*

I confronti statistici sono stati eseguiti, per i dati raccolti, sia in base alla tipologia di gabbia sia in base alla banda di appartenenza. L'elaborazione è avvenuta attraverso il software SPSS-IBM, secondo un modello statistico che prevede come fattori fissi la tipologia di gabbia e la banda (stagionalità), covariando i dati relativi al parto e alla lattazione per i nati vivi storici di ciascuna scrofa, allo scopo di ridurre, almeno in parte, il fattore genetico relativo alla prolificità. Allo stesso modo il numero di suinetti svezzati è stato covariato per gli svezzati storici di ciascuna scrofa. La significatività (P) è stata posta a 0,05.

#### **RISULTATI**

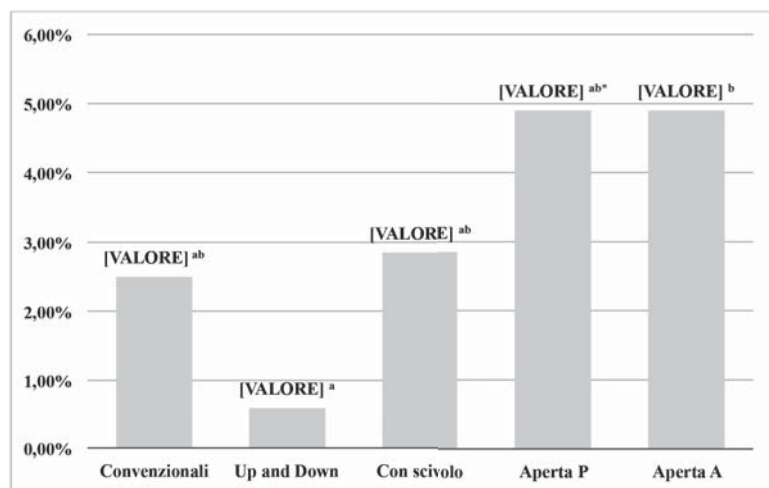
L'analisi statistica dei dati in nostro possesso non ha riportato alcuna differenza significativa in quanto nati vivi, nati morti e mummificati nelle diverse tipologie di gabbie parto. La mortalità, invece, ha mostrato dati interessanti sia per quanto riguarda il tipo di gabbia utilizzato ( $P=0.011$ ) sia per quanto riguarda la stagionalità ( $P=0.001$ ). Nella Tabella 2 sono riportati i dati relativi alla mortalità totale avuta in lattazione in relazione alla tipologia di gabbia parto, riportando anche la suddivisione in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa.

| Parametro               | Convenzionali            | Up and down             | Con scivolo               | Aperte P                  | Aperte A                 |
|-------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Nati vivi/scrofa        | 15,9                     | 15,5                    | 14                        | 16,3                      | 16,2                     |
| Morti totali/scrofa (%) | 1,1 (6,9%) <sup>ab</sup> | 0,7 (4,5%) <sup>a</sup> | 0,8 (5,7%) <sup>a</sup>   | 1,9 (11,6%) <sup>b</sup>  | 1,2 (7,4%) <sup>ab</sup> |
| - Schiacciati (%)       | 0,4 (2,5%) <sup>ab</sup> | 0,1 (0,6%) <sup>a</sup> | 0,4 (2,85%) <sup>ab</sup> | 0,8 (4,9%) <sup>ab*</sup> | 0,8 (4,9%) <sup>b</sup>  |
| - Altra causa (%)       | 0,7 (4,4%)               | 0,6 (3,9%)              | 0,4 (2,85%)               | 1,1 (6,7%)                | 0,4 (2,5%)               |

**Tabella 2.** Valore medio e percentuale dei dati relativi alla mortalità totale, alla mortalità per schiacciamento e alla mortalità per altra causa, in relazione alla tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: elevato Standard Error ( $ES=0,22$ ), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Table 2.** Mean and percentage value of data on total mortality, crushing mortality and mortality due to other causes, depending on the type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: high Standard Error ( $ES=0,22$ ), indicative of a high population variability within the open cage P.

Per quanto riguarda la mortalità totale, la gabbia con meccanismo “up and down” è risultata essere la migliore, mostrando una elevata differenza significativa con la gabbia aperta P ( $P=0.008$ ), che invece si è dimostrata essere la tipologia di gabbia peggiore, evidenziando una differenza significativa anche nei confronti della gabbia con scivolo ( $P=0.035$ ). Analizzando nello specifico le cause di mortalità, però, si ha avuto l'interessante scoperta che i suinetti morti per altra causa, pur essendo in proporzione maggiori rispetto ai suinetti schiacciati, non hanno rilevato differenze significative confrontando i diversi tipi di gabbia ( $P>0.05$ ), mentre, al contrario, gli schiacciati hanno mostrato importanti differenze significative tra le gabbie ( $P=0.003$ ). Il Grafico 1 illustra quanto riportato in Tabella 2 in merito alla mortalità per schiacciamento.



**Grafico 1.** Percentuali relative alla mortalità per schiacciamento in relazione alla diversa tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: elevato Standard Error ( $ES=0,22$ ), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Graphic 1.** Percentages related to crushing mortality in relation to the different type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: high Standard Error ( $ES=0,22$ ), indicative of a high population variability within the open cage P.



Il Grafico 1 mostra in maniera molto efficace come la gabbia con meccanismo “up and down” risulta essere la tipologia di gabbia migliore per quanto riguarda la mortalità per schiacciamento, differendo in maniera statisticamente significativa con la gabbia aperta A ( $P=0.003$ ). Il simbolo (\*), riportato sia all’interno della Tabella 2 che all’interno del Grafico 1, denota la presenza di un elevato Standard Error ( $ES=0.22$ ) per quel parametro, il che indica un’elevata variabilità della popolazione all’interno della gabbia aperta P, giustificando il fatto che, pur avendo uno dei valori numerici peggiori, mostra solo una tendenza verso la gabbia con meccanismo “up and down” ( $P=0.053$ ).

Nella Tabella 3, invece, sono inseriti i dati relativi alla mortalità totale in relazione alla banda, quindi alla stagionalità, riportando anche in questo caso la suddivisione in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa.

| Parametro                      | Periodo 1                | Periodo 2                | Periodo 3                 | Periodo 4               | Periodo 5                |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|
| <b>Nati vivi/scrofa</b>        | 15,65                    | 15,05                    | 16,5                      | 15,9                    | 14,8                     |
| <b>Morti totali/scrofa (%)</b> | 1,0 (6,4%) <sup>ab</sup> | 0,9 (6,0%) <sup>a</sup>  | 1,5 (9,1%) <sup>ab</sup>  | 0,6 (3,8%) <sup>a</sup> | 1,7 (11,5%) <sup>b</sup> |
| <b>- Schiacciati (%)</b>       | 0,7 (4,5%)               | 0,3 (2,0%)               | 0,5 (3,0%)                | 0,3 (1,9)               | 0,8 (5,4%)               |
| <b>- Altra causa (%)</b>       | 0,3 (1,9%) <sup>a</sup>  | 0,6 (4,0%) <sup>ab</sup> | 1,0 (6,1%) <sup>ab*</sup> | 0,3 (1,9%) <sup>a</sup> | 0,9 (6,1%) <sup>b</sup>  |

**Tabella 3.** Valore medio e percentuale dei dati relativi alla mortalità totale, alla mortalità per schiacciamento e alla mortalità per altra causa, in relazione alla stagionalità (numero di periodo). a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: elevato Standard Error ( $ES=0,23$ ), indice di un’elevata variabilità di popolazione all’interno della Banda 3.

**Table 3.** Mean and percentage value of data on total mortality, crushing mortality and mortality due to other causes, depending on the season (batch number). a, b:  $P \leq 0,05$ . \*: high Standard Error ( $ES=0,23$ ), indicative of a high population variability within the batch 3.

La mortalità totale riscontrata in lattazione si è rilevata essere maggiore durante i periodi più caldi (Periodo 5, giugno-luglio) e minore durante il periodo primaverile (Banda Periodo, maggio), evidenziando una grande differenza significativa tra i due periodi ( $P=0.001$ ). In questo caso, analizzando nello specifico le cause di mortalità, si è riscontrata una situazione opposta alla precedente: i suinetti morti schiacciati, infatti, non hanno rilevato differenze significative in base alla stagione ( $P>0.05$ ), mentre i suinetti morti per altra causa hanno evidenziato differenze significative a seconda del periodo considerato ( $P=0.001$ ). In particolare, il periodo più caldo (5) si conferma essere il momento che più influenza la mortalità per cause diverse dallo schiacciamento, mostrando un grande distacco sia con il Periodo 4 ( $P=0.008$ ) che con il Periodo 1 (gennaio-febbraio,  $P=0.10$ ). Il simbolo (\*), riportato all’interno della Tabella 3, denota la presenza di un elevato Standard Error ( $ES=0.23$ ) per quel parametro, il che indica un’elevata variabilità della popolazione all’interno del Periodo 3, giustificando il fatto che, pur avendo il valore numerico peggiore, mostra solo una tendenza verso il Periodo 1 ( $P=0.069$ ) ed il Periodo 4 ( $P=0.055$ ).

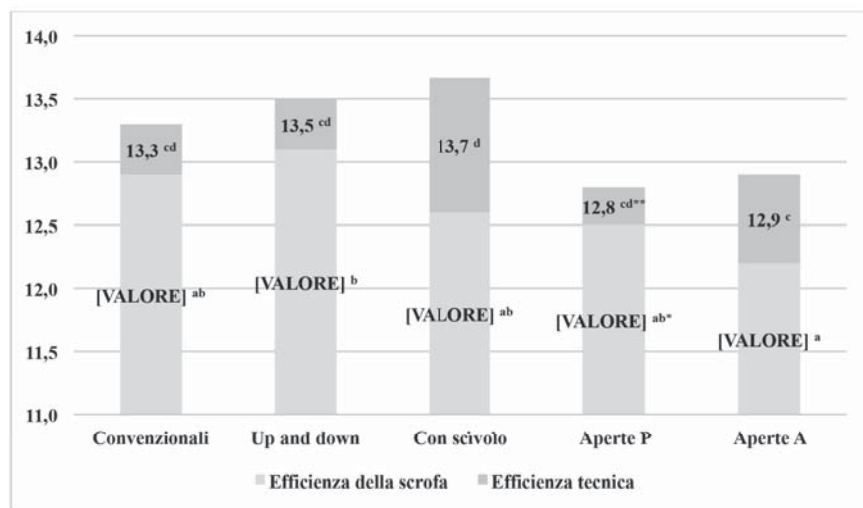
Infine, è stata analizzata l’efficienza totale della sala parto e nella tabella 4 sono riportati il numero di nati vivi per scrofa, l’efficienza della scrofa e l’efficienza tecnica, in relazione alla tipologia di gabbia parto.

| Parametro                      | Convenzionali      | Up and down        | Con scivolo        | Aperte P             | Aperte A          |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------|-------------------|
| <b>Nati vivi/scrofa</b>        | 15,9               | 15,5               | 14                 | 16,3                 | 16,2              |
| <b>Efficienza della scrofa</b> | 12,9 <sup>ab</sup> | 13,1 <sup>b</sup>  | 12,6 <sup>ab</sup> | 12,5 <sup>ab*</sup>  | 12,2 <sup>a</sup> |
| <b>Efficienza tecnica</b>      | 13,3 <sup>cd</sup> | 13,5 <sup>cd</sup> | 13,7 <sup>d</sup>  | 12,8 <sup>cd**</sup> | 12,9 <sup>c</sup> |

**Tabella 4.** Numero di nati vivi per scrofa, efficienza della scrofa ed efficienza tecnica, in relazione alla tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ ; c, d:  $P \leq 0,1$ . \*, \*\*: elevato Standard Error (\*ES=0,29; \*\*ES=0,32), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Table 4.** Number of piglets born alive, sow efficiency and technical efficiency, depending on the type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0,05$ ; c, d:  $P \leq 0,1$ . \*, \*\*: high Standard Error (\*ES=0,29; \*\*ES=0,32), indicative of a high population variability within the open cage P.

L'efficienza della scrofa è stata migliore nella gabbia con meccanismo "up and down", che infatti ha svezzato il maggior numero di suinetti, confermando quanto riscontrato in merito alla mortalità in lattazione e differendo in maniera significativa dalla gabbia aperta A ( $P=0,021$ ). In quanto efficienza tecnica non sono state riscontrate marcate differenze di significatività tra le diverse tipologie di gabbia parto, ma una semplice tendenza a favore della gabbia con scivolo e a sfavore della gabbia aperta A ( $P=0,054$ ). Il Grafico 2 illustra in maniera esplicativa l'efficienza totale della sala parto.



**Grafico 2.** Efficienza totale della sala parto, suddivisa in efficienza della scrofa ed efficienza tecnica, in base alla tipologia di gabbia parto. a, b:  $P \leq 0,05$ ; c, d:  $P \leq 0,1$ . \*, \*\*: elevato Standard Error (\*ES=0,29; \*\*ES=0,32), indice di un'elevata variabilità di popolazione all'interno della gabbia aperta P.

**Graphic 2.** Total efficiency of farrowing room, divided into sow efficiency and technical efficiency, depending on the type of farrowing cage. a, b:  $P \leq 0,05$ ; c, d:  $P \leq 0,1$ . \*, \*\*: high Standard Error (\*ES=0,29; \*\*ES=0,32), indicative of a high population variability within the open cage P.

Grazie al Grafico 2 è possibile evidenziare come la gabbia parto con meccanismo “up and down” ha avuto un’efficienza della scrofa migliore, quindi ha svezzato un numero maggiore di suinetti per scrofa, mentre la gabbia parto con scivolo ha avuto una efficienza tecnica migliore, ovvero ha svezzato un numero totale di suinetti maggiore, comprendendo anche i suinetti in precedenza usciti grazie all’applicazione delle adozioni.

## DISCUSSIONE

La maggior parte della mortalità nell’industria suinicola si verifica durante il periodo di lattazione, contribuendo in larga misura a diminuire il totale della redditività aziendale (Nuntapaithoon e Tummaruk, 2017). La conoscenza delle principali cause di decesso dei suinetti in lattazione consente di ideare nuove strategie volte a ridurre le perdite economiche aziendali. Nella parte introduttiva di questo studio, sono stati già spiegati i principali fattori che influenzano la mortalità pre-svezzamento, dividendoli in tre grandi categorie: suinetto, scrofa e ambiente. Tutto, però, si riassume in due principali cause: lo schiacciamento e l’inedia, dove la prima è spesso una conseguenza della seconda. Questo studio mira a valutare se l’utilizzo di gabbie parto innovative comporti o meno una riduzione della mortalità pre-svezzamento e se, anche la stagione possa influenzare questo fondamentale parametro.

Dai risultati ottenuti dall’analisi statistica è stato possibile evincere che la mortalità pre-svezzamento dipende sia dal tipo di gabbia utilizzato sia dalla stagione in cui si è verificato il parto. Suddividendo la mortalità totale in mortalità per schiacciamento e mortalità per altra causa, la statistica ha rilevato che, in realtà, il tipo di gabbia influenza maggiormente la mortalità causata dallo schiacciamento e, viceversa, il periodo stagionale compromette maggiormente la mortalità per altra causa, includendo in questo termine la mortalità da inedia, diarrea, malattie infettive e operazioni di castrazioni e/o ernie con esito negativo. A causa del riscontro di questa differenziazione, perde il senso parlare esclusivamente di mortalità totale pre-svezzamento, mentre risulta più interessante discutere separatamente delle due cause di mortalità.

Per quanto riguarda la mortalità da schiacciamento, il nostro studio ha evidenziato una netta riduzione di decessi con l’utilizzo della gabbia con meccanismo “up and down”, che, grazie alla presenza del sensore meccanico, impedisce il travolgimento dei suinetti da parte della madre durante i suoi movimenti di cambio posizione nel corso della lattazione. Le gabbie con scivolo, invece, hanno riportato una percentuale di mortalità da schiacciamento paragonabile a quella riscontrata nelle gabbie convenzionali, contrariamente a quanto riscontrato in uno studio preliminare (Mazzoni et al., 2018) effettuato sulle stesse tipologie di gabbie parto, escluse le gabbie aperte. Il motivo dietro a questa discrepanza è rappresentato dal fatto che lo studio di Mazzoni et al. (2018) ha preso in considerazione solo i primi 3 giorni di vita dei suinetti, mentre il nostro studio ha valutato l’intero periodo di lattazione. Ciò evidenzia che il meccanismo della gabbia con scivolo, ovvero la presenza di un piano inclinato (scivolo) che si collega direttamente al nido in acciaio e che consente al suinetto di riprendersi dalla nascita prima di affrontare la competizione per il capezzolo, si rileva molto utile durante i primi 3 giorni di vita, ma nei giorni successivi questo tipo di gabbia si tramuta in una normale gabbia convenzionale, rendendo paragonabile la mortalità dovuta allo schiacciamento. Le gabbie parto aperte, sia con pavimentazione in plastica che in acciaio, hanno invece mostrato i risultati peggiori in quanto schiacciamento, ma ciò non deve essere motivo di stupore, in quanto già studi precedenti (Condous et al., 2016) avevano dimostrato che l’utilizzo di questa tipologia di gabbia parto migliora senza dubbio lo stress della scrofa nel peri-parto ma aumenta il numero di suinetti schiacciati rispetto alle gabbie parto convenzionali. D’altronde, la decisione di limitare i movimenti della scrofa durante il parto e la lattazione, al fine di ridurre lo schiacciamento dei suinetti, risale al 1960, quando è avvenuta la conversione dei

box parto aperti in gabbie convenzionali chiuse (Jarvis et al., 2005; Ostovic et al., 2012), anche se il confinamento in gabbia rappresenta un fattore stressante per la scrofa che potrebbe reagire aggredendo i propri suinetti (Danholt et al., 2011). Tuttavia, l'utilizzo delle gabbie parto aperte migliora senz'altro il benessere della scrofa, in quanto le viene concessa la libertà di esprimere il proprio comportamento fisiologico, che si traduce nella costruzione del nido per la sua prole (Damm e Pedersen, 2000), con conseguente riduzione dello stress preparto e riduzione della lunghezza del parto, determinando una maggiore vitalità e spirito di sopravvivenza nei suinetti (Gastaldo, 2017). Al fine del nostro studio, comunque, la gabbia parto migliore è risultata essere quella con meccanismo "up and down", che prevede comunque il totale contenimento della scrofa, ma aumenta notevolmente il benessere dei suinetti riducendone la mortalità per schiacciamento. Tutto ciò viene confermato, all'interno del nostro studio, da un numero maggiore di suinetti svezzati per scrofa (efficienza della scrofa) per le gabbie con meccanismo "up and down", che superano in maniera significativa le gabbie aperte, le quali, avendo avuto una maggiore mortalità in lattazione, inevitabilmente hanno svezzato un minor numero di suinetti.

Studi precedenti (Yuzhi et al., 2014; Mondal et al., 2012; Muns et al., 2016) hanno constatato che la mortalità pre-svezzamento dipende anche dal periodo stagionale. Nel nostro studio, in particolare, è la mortalità per altra causa a risentire maggiormente dell'influsso stagionale, evidenziando il periodo più caldo dello studio (giugno-luglio) come il più predisponente alla mortalità per cause diverse dallo schiacciamento. Anche Yuzhi et al. (2014) hanno riscontrato una mortalità in lattazione maggiore durante i mesi estivi, il che si è tradotto, per loro come anche per noi, in un minor numero di suinetti svezzati in tale periodo. Lo stress da caldo conduce ad una minore ingestione di alimento da parte della scrofa, con conseguente calo del lardo dorsale e calo della produzione di latte, intaccando così la crescita dei suinetti (McNamara e Pettigrew, 2002). Lo stress da caldo incide anche sul parto, aumentandone la difficoltà (Yuzhi et al., 2014) e la lunghezza, con conseguenze negative sulla vitalità dei suinetti (Tummaruk et al., 2017). Yuzhi et al. (2014) hanno comunque constatato che, alleviando lo stress da caldo, si riduce la mortalità pre-svezzamento. Evidenti, a questo riguardo, i possibili vantaggi derivanti dall'impiego di sistemi strutturali, ad esempio i cooler, in grado di abbassare le temperature nel periodo estivo. Le gabbie con scivolo, seppur non hanno mostrato evidenti vantaggi nel prevenire lo schiacciamento nel corso dell'intera lattazione rispetto alle gabbie convenzionali, si prestano bene per affrontare questo tipo di perdita. Infatti, la presenza di uno scivolo che indirizza i suinetti appena nati direttamente all'interno di un nido riscaldato e parzialmente isolato dalla scrofa, è un utile strumento in sala parto, soprattutto in corso di parti notturni, parti non assistiti e parti che si verificano nel weekend, dove solitamente il personale è ridotto. È importante sapere che i suinetti nascono bagnati dai fluidi placentari, i quali, evaporando, raffreddano il loro corpo. I nuovi nati, però, non potranno contrastare questo calo della temperatura poiché nascono sprovvisti di tessuto adiposo bruno, che negli altri animali funge da termoregolatore (Tummaruk et al., 2017). Inoltre i suinetti meno vitali, possono impiegare più di 3 ore a raggiungere il capezzolo e a fare la prima poppata di colostro, che rappresenta per loro la più importante fonte di calore ed energia, rischiando quindi di incorrere in un calo drastico di temperatura che li condurrà alla morte (Andersen et al., 2009). Se viene a mancare un'adeguata assistenza al parto, intesa come prendersi cura dei suinetti più bisognosi, la gabbia con scivolo rappresenta un importante aiuto manageriale, soprattutto nei periodi di calura estiva, in cui anche la scrofa si trova in difficoltà ad aiutare la propria prole, in quanto fornisce il tempo ai suinetti di riprendersi dalla nascita, asciugarsi e scaldarsi prima di approcciare alla madre per il nutrimento. Probabilmente è anche per questo motivo che l'efficienza tecnica è stata migliore in questa tipologia di gabbia parto rispetto alle altre tipologie di gabbie parto, anche se ulteriori approfondimenti sono necessari al riguardo.

In generale la scelta della tipologia di gabbia parto può aiutare senz'altro nella riduzione della mortalità, in particolare quella causata dallo schiacciamento, ma anche un'adeguata gestione della sala parto, soprattutto nei mesi più critici, può contribuire ad una riduzione della mortalità, aumentando così il numero di suinetti svezzati e, quindi, la redditività aziendale.

## CONCLUSIONI

La mortalità pre-svezzamento rappresenta un serio ed importante problema economico e sociale, di grande preoccupazione per l'industria suinicola. Sono tanti i fattori che possono influenzare la mortalità durante la lattazione, tra cui i più importanti lo schiacciamento e l'inedia. Dai risultati ottenuti da questo studio è possibile affermare che tutte le tipologie di gabbie parto utilizzate sono utili a qualche scopo, seppur diversi tra loro. In particolare, la gabbia con meccanismo "up and down" consente una notevole riduzione dei suinetti schiacciati e, di conseguenza, aumenta il numero di suinetti svezzati per scrofa (efficienza della scrofa). La gabbia con scivolo, invece, migliora l'efficienza tecnica della sala parto, essendo utile soprattutto in quelle realtà aziendali in cui non viene effettuata l'assistenza al parto o in caso di parti notturni e festivi. La gabbia aperta, infine, garantisce alla scrofa un maggiore benessere peri-parto, ma, attualmente, causa un maggior numero di mortalità per schiacciamento. I periodi caldi, inoltre, si sono dimostrati critici per la mortalità pre-svezzamento, a causa dello stress da caldo procurato alla scrofa.

## RINGRAZIAMENTI

Corre graditissimo l'obbligo di ringraziare il dott. Daniele Pedercini (Evotek srl di Manerbio-BS-) per aver reso possibile lo svolgimento di questa ricerca oltre che un sentito ringraziamento alla Famiglia Cremaschini tutta, per aver messo a disposizione, con grande generosità, la sua azienda affinché lo studio avesse luogo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alonso-Spilsbury M., Ramírez-Necoechea R., González-Lozano M., Mota-Rojas D., Trujillo-Ortega M. E. (2007) "Piglet survival in early lactation: a review". *J. Anim. Vet. Adv.* 6, 76-86.
2. Andersen I. L., Haukvik I. A., Bøe K. (2009) "Drying and warming immediately after birth may reduce piglet mortality in loose-housed sows". *Animal* 3:592-597.
3. Condous P. C., Plush K. J., Tilbrook A. J., Van Wettere W. H. (2016) "Reducing sow confinement during farrowing and in early lactation increases piglet mortality". *J Anim Sci.* 94(7), 3022-9.
4. Damm B. I., Pedersen L. J. (2000) "Eliminative behaviour in preparturient gilts previously kept in pens or stalls". *Acta Agric Scand, Sect A.* 50:316-320.
5. Danholt L., Moustsen V. A., Nielsen M. B. F., Kristensen A. R. (2011) "Rolling behaviour of sows in relation to piglet crushing on sloped versus level floor pens". *Livest Sci.* 141:59-68.
6. 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>
7. Gastaldo A. (2017) "Soluzioni 'animal friendly' per scrofe allattanti". *Professione suinicoltore*, 8, 14-17.
8. Jarvis S., D'Eath R. B., Fujita K. (2005) "Consistency of piglet crushing by sows". *Anim Welfare.* 14:43-51.
9. Kilbride A. L., Mendl M., Statham P., Held S., Harris M., Cooper S., Green L. E. (2012) "A cohort study of preweaning piglet mortality and farrowing accommodation on 112

- commercial pig farms in England”. *Preventive Veterinary Medicine* 104, 281–291.
10. Kirkden R. D., Broom D. M., Andersen I. L. (2013) “Invited review: piglet mortality: management solutions”. *J Anim Sci.* 91:3361–3389.
  11. Koketsu Y., Takenobu S., Nakamura R. (2006) “Prewaning mortality risks and recorded 17/19 causes of death associated with production factors in swine breeding herds in Japan”. *J Vet Med Sci* 68(8), 821-826.
  12. Mazzoni C., Scollo A., Righi F., Bigliardi B., Di Ianni F., Bertocchi M., Parmigiani E., Bresciani C. (2018) “Effects of three different designed farrowing crates on neonatal piglets crushing: preliminary study”. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 17, no. 2, 505–510.
  13. McNamara J. P., Pettigrew J. E. (2002) “Protein and fat utilization in lactating sows: I. Effects on milk production and body composition”. *J Anim Sci.* 80:2442–2451.
  14. Mondal S. K., De U. K., Das G. K., Powde A. M., Verma A. K. (2012) “Pattern of mortality of crossbred pigs in an organized swine production farm”. *J. Livest. Sci.*, 3: 37-44.
  15. Muns R., Manzanilla E. G., Sol C., Manteca X., Gasa J. (2013) “Piglet behavior as a measure of vitality and its influence on piglet survival and growth during lactation”. *J Anim Sci.* 91:1838–1843.
  16. Muns R., Nuntapaitoon M., Tummaruk P. (2016) “Non-infectious causes of pre-weaning mortality in piglets”. *Livest Sci.* 184, 46–57.
  17. Muns R., Tummaruk P. (2016) “Management strategies in the farrowing house to improve piglet pre-weaning survival and growth”. *Thai J. Vet. Med.* 46, 347-354.
  18. Nardone A., Ronchi B., Lacetera N., Ranieri M. S., Bernabucci U. (2010) “Effects of climate changes on animal production and sustainability of livestock systems”. *Livestock Science*, 130, 57–69.
  19. Nuntapaitoon M., Tummaruk P. (2015) “Piglets pre-weaning mortality in a commercial swine herd in Thailand”. *Tropical Animal Health and Production* 47, 1539–1546.
  20. Nuntapaitoon M., Tummaruk P. (2017) “Factors influencing piglet pre-weaning mortality in 47 commercial swine herds in Thailand”. *Tropical Animal Health and Production*, September 2017.
  21. Ostovic M., Pavicic Z., Tofant A., Kabalin A. E., Mencik S., Potocnjak D., Antunovic B. (2012) “Sow parity, body length, postural changes and piglet crushing”. *Veterinarski Archiv.* 82:319–326.
  22. Tummaruk P., Nuntapaitoon M., Muns R. (2017) “Management strategies to reduce piglet pre-weaning mortality”. *Thai J Vet Med Suppl.* 47: S17-S20.
  23. Vaillancourt J. P., Stein T. E., Marsh W. E., Leman A. D., Dial G. D. (1990) “Validation of producer-recorded causes of preweaning mortality in swine”. *Prev. Vet. Med.* 10, 119–130.
  24. Vasdal G., Glaerum M., Melisova M., Boe K. E., Broom D. M., Andersen I. L. (2010) “Increasing the pigs’ use of the creep area-a battle against biology?” *Appl Anim Behav Sci.* 125:96–102.
  25. Yuzhi L.; Lee J., Hilbrands A. (2010) “Pre-weaning mortality of piglets in a bedded group-farrowing system”. *Journal of Swine Health and Production*, March 2010.





# PERICARDITE DA *MYCOPLASMA HYORHINIS* IN UN SUINETTO IN SVEZZAMENTO

ROSSI E.<sup>1</sup>, USTULIN M.<sup>2</sup>, TARGHETTA C.<sup>2</sup>, TAGLIENTE D.<sup>2</sup>, VIO D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Libera professionista, Montebelluna (TV)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, SCT4-PN

## INTRODUZIONE

Il presente report descrive un caso di pericardite da *Mycoplasma hyorhinis* (*M. hyorhinis*) in un suinetto svezzato con sintomatologia respiratoria e ritardo di crescita conferito presso la Sezione di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie.

Pur essendo presente anche nelle vie respiratorie di animali sani, *M. hyorhinis* è agente eziologico riconosciuto di polisierositi tuttavia non viene comunemente ricercato. È inoltre segnalato in letteratura che possa essere portatore di geni di antibiotico resistenza (Wu et al., 2000).

Oltre a riportare il caso si vuole sottolineare l'importanza di un protocollo diagnostico completo che metta *M. hyorhinis* in diagnosi differenziale nelle forme di polisierosite.

## DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso in analisi è stato conferito presso il Laboratorio di Diagnostica Clinica della Sezione Territoriale di Pordenone nel mese di luglio del 2019. Il campione era costituito da un suinetto svezzato di circa 40 giorni di vita e 8 kg di peso, con anamnesi riferibile a ritardo di crescita e sintomatologia respiratoria. Il soggetto non risultava sottoposto a trattamenti antibiotici ed era stato sacrificato per essere sottoposto a screening diagnostico.

L'allevamento di provenienza è un allevamento da riproduzione a ciclo aperto con 550 scrofe in produzione. I suinetti vengono vaccinati a 28 giorni di vita per *M. hyopneumoniae* e a 28 giorni di vita per PCV2. Sono segnalate problematiche respiratorie riferibili a polmonite enzootica a partire dai 150 giorni di vita e sono note precedenti positività per *M. hyorhins* da Lavaggi Bronco-Alveolari (BAL) prelevati in animali in svezzamento (28-80 giorni di vita). Sono inoltre segnalate lesioni polmonari da micoplasmi al macello verificate tramite score polmonari effettuati nel corso del 2018. La scrofaia è positiva per PRRS.

All'esame necroscopico è stata evidenziata polisierosite fibrinosa, particolarmente grave a livello del pericardio che si presentava marcatamente ispessito. Era inoltre presente un accumulo materiale fibrinoso nel sacco pericardico ed erano evidenti aderenze tra pericardio ed epicardio e tra pericardio e pleura viscerale (Fig. 1); si riscontrava bronchite catarrale.

Ulteriori lesioni anatomo-patologiche includevano linfadenomegalia a carico dei linfonodi mesenterici e un modesto aumento del liquido articolare a carico di articolazioni dei carpi e dei tarsi.

Sono stati effettuati esami batteriologici da pericardio, carpo, polmone, bronco, linfonodi mesenterico e intestino. Il protocollo batteriologico applicato era idoneo all'isolamento di germi patogeni esigenti per il suino con particolare attenzione a *Haemophilus parasuis* (*H. parasuis*). Il liquido pericardico e il liquido articolare del carpo sono stati sottoposti alla ricerca in PCR di patogeni in grado di causare lesioni riferibili a polisierosite-artrite, nello specifico *H. parasuis* e *M. hyorhinis*.

Le analisi batteriologiche hanno permesso di isolare *H. parasuis* dal polmone, mentre bronco, pericardio e carpo sono risultati negativi.

Il liquido pericardico è risultato positivo in PCR per *M. hyorhinis* e negativo per *H. parasuis*, il tampone prelevato dal carpo è risultato negativo per entrambi.

Verificata la positività in PCR per *M. hyorhinis*, il campione è stato sottoposto a indagini colturali per l'isolamento di micoplasmi, permettendo così di ottenere un ceppo vitale di *M. hyorhinis*. Tale ceppo è stato successivamente sottoposto a verifica del profilo di antibiotico resistenza tramite determinazione della MIC in micrometodo.

Il ceppo è risultato sensibile a Florfenicolo, Ossitetraciclina, Tiamulina, Spectinomina e resistente a Enrofloxacin, Eritromicina, Lincomicina, Spiramicina, Tilmicosina, Tilosina.

Da linfonodo mesenterico e intestino sono stati isolati un ceppo di *Escherichia coli* (*E. coli*) emolitico e uno non emolitico. La tipizzazione del ceppo di *E. coli* emolitico, eseguita con tecniche biomolecolari, ha evidenziato la presenza della fimbria F18 e del gene codificante per l'antigene somatico O139; tuttavia non sono stati evidenziati geni codificanti per tossine, il ceppo non è da considerarsi pertanto in grado di determinare patologia.

Come ulteriori verifiche sullo stato sanitario del soggetto è stata indagata la presenza di virus che possano svolgere il ruolo di fattori predisponenti per patologie respiratorie, evidenziando positività per PRRSV e negatività per PCV2 del tessuto polmonare. La ricerca di virus influenzali tramite PCR condotta su tamponi bronchiali hanno dato esito negativo.



**Fig.1** Pericardite fibrinosa/fibrinous pericarditis

## DISCUSSIONE

Il caso descritto è riferibile a pericardite cronica causata da *M. hyorhinis*.

*M. hyorhinis* è un batterio che può essere isolato frequentemente in allevamenti suini e che può colonizzare precocemente le cavità nasali dei suinetti (Clavijo et al., 2017, Ustulin et al., 2019). Pur essendo noto il ruolo di questo Micoplasma nello sviluppo di polisierositi (Kobish e Friis, 1996), spesso la diagnosi viene resa difficoltosa dalle particolari caratteristiche di crescita del batterio che, oltre ad essere molto esigente, richiede tempi di incubazione lunghi. Altri patogeni meno esigenti possono dare lesioni sovrapponibili, tra questi *H. parasuis* e *Streptococcus suis* e sono descritti casi di co-infezione. Una corretta diagnosi eziologica è tuttavia necessaria per stabilire un corretto protocollo terapeutico è importante quindi non trascurare il ruolo di *M. hyorhinis* nella diagnosi differenziale delle sindromi di polisierosite.

Il profilo di antibiotico resistenza del ceppo di *M. hyorhinis* ottenuto da questo caso

clinico risulta particolarmente interessante: la resistenza a numerose molecole antibiotiche rilevata, inclusi macrolidi quali Tilosina e Tilmicosina, già segnalata, anche recentemente, in bibliografia (Beko et al.,2019) sottolinea l'importanza di tenere monitorati i profili di antibiotico sensibilità o anche nei batteri particolarmente esigenti. Ai fini della scelta terapeutica mirata, la costruzione di un archivio di dati di MIC permette in caso di episodi clinici con sintomatologia compatibile con infezioni da Micoplasmi, di intervenire sulla base del dato storico. Nell'ottica della prevenzione delle malattie la possibilità di poter disporre del ceppo batterico isolato permette di prendere in considerazione lo sviluppo di un vaccino stabulogeno.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Bekő K, Felde O, Sulyok KM, Kreizinger Z, Hrivnák V, Kiss K, Biksi I, Jerzsele Á, Gyuranecz M. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hyorhinis* strains isolated from swine in Hungary. Vet Microbiol. 2019 Jan;228:196-201. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.11.027. Epub 2018 Nov 28. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.11.027
2. Clavijo M., Murray D., Oliveira S., Rovira A. (2017) "Infection dynamics of *Mycoplasma hyorhinis* in three commercial pig populations" VetRec doi: 10.1136/vr.104064.
3. Kobisch M, Friis NF, Swine mycoplasmoses. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 1996, 15 (4), 1569-1605
4. Ustulin M., Catania S., Gobbo F., Fincato A., Targhetta C., Toson M., Vio D., (2019) "Studio sulla trasmissione di *Mycoplasma hyorhinis*". Atti della Società Italiana di Patologia e Allevamento dei Suini, XLV Meeting Annuale.
5. Wu, C.C., Shryock, T.R., Lin, T.L., Faderan, M., Veenhuizen, M.F.,2000. Antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis*. Vet. Microbiol. 76, 25–30.



# ACCASAMENTO DI SUINI NON CAUDECTOMIZZATI IN ALLEVAMENTI DEL VENETO: RISULTATI PRELIMINARI DELLA FASE VOLONTARIA DI APPLICAZIONE DEL PIANO D'AZIONE NAZIONALE

## REARING UNDOCKED PIGS IN VENETO: PRELIMINARY RESULTS OF THE VOLUNTARY PHASE FOR THE APPLICATION OF NATIONAL ACTION PLAN

SANTINI A.<sup>1</sup>, TARAKDJIAN J.<sup>1</sup>, PASQUALIN D.<sup>1</sup>, CUNIAL G.<sup>1</sup>, MAISANO A.M.<sup>2</sup>,  
ALBORALI G.L.<sup>2</sup>, D'ALBA A.<sup>3</sup>, DI MARTINO G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italia*

<sup>2</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia*

<sup>3</sup>*Regione Veneto, Venezia, Italia*

**Parole chiave:** Benessere animale, taglio della coda, morsicatura della coda

**Key words:** Animal welfare, tail docking; tail biting

### RIASSUNTO

Questo studio presenta i risultati preliminari ottenuti in Veneto nel corso del piano volontario del 2019 di accasamento di suini non caudectomizzati in allevamenti commerciali. La valutazione è stata effettuata in 6 siti (tre aziende A, B e C a ciclo chiuso) dopo l'adeguamento delle non conformità rilevate in ClassyFarm nella fase di autocontrollo per il rischio di morsicatura. I box con animali non caudectomizzati sono stati affiancati da gruppi di controllo a coda mozzata, nelle medesime condizioni di allevamento. I risultati hanno evidenziato la presenza di alcuni focolai di morsicatura in momenti diversi del ciclo (fine svezzamento e inizio ingrasso), che se pur correttamente gestiti dagli allevatori hanno esitato in una non trascurabile ( $14\pm5\%$ ) frequenza di lesioni alla coda in fase di macellazione, pur senza alcuna compromissione delle carcasse. Gli allevatori dovranno adoperarsi ulteriormente sul miglioramento dei parametri ambientali e gestionali per ridurre l'incidenza di morsicature a livelli più accettabili.

### ABSTRACT

This study presents the preliminary results in Veneto during the voluntary phase of rearing undocked pigs in commercial farms. The assessment has been carried out in 6 sites (three farrow to finish farms: A, B and C) after the achievement of the compliance to the criticisms evidenced by the risk evaluation in ClassyFarm online system. Pens with undocked pigs were coupled by docked control groups under the same husbandry conditions. Results evidenced some tail biting outbreaks at different time points throughout the productive cycle (end of weaner and beginning of fattening phase), which were promptly managed by farmers. A not negligible frequency of tail lesions was detected at slaughter ( $14\pm5\%$ ), without compromising carcass quality. Farmers are requested to make further amendments regarding management and the environment to reduce biting incidence to more acceptable levels.

### INTRODUZIONE

La direttiva 2008/120/CE del Consiglio europeo (recepita in Italia con il D. Lgs 122/2011), non consente il mozzamento della coda quale procedura di routine preventiva del rischio di morsicatura. La mutilazione può tuttavia essere effettuata a seguito di parere veterinario in situazioni critiche (presenza di lesioni alle code e alle orecchie), dopo aver messo in atto tutte

le possibili misure di prevenzione, in particolare la fornitura di adeguati materiali manipolabili, la riduzione delle densità di stabulazione e interventi sul microclima (temperatura, umidità, livelli di gas nocivi) (EFSA 2007). Nel 2016 la Raccomandazione della Commissione Europea n. 336 ha ulteriormente ribadito la necessità di effettuare una accurata valutazione di tutti i possibili fattori di rischio di morsicatura da parte di ciascun allevatore, e chiarito i requisiti minimi dei materiali manipolabili conformi alle esigenze etologiche dei suini (Commissione Europea, 2016). In risposta a queste indicazioni alcuni Paesi caratterizzati da limitati volumi di produzione suinicola (Svezia, Norvegia, Finlandia) da anni riescono ad allevare suini non caudectomizzati (Wallgren et al., 2019), mentre nella maggioranza degli altri Stati membri, tra cui l'Italia, questa mutilazione risulta ancora ampiamente presente (EFSA 2007).

Nel novembre 2017 la Commissione Europea ha programmato un audit in Italia per valutare il livello di conformità in merito alla problematica del mozzamento della coda e, più in generale, ai principi enunciati nella direttiva 2008/120/CE. Il Report pubblicato (Commissione Europea, 2017) ha evidenziato delle criticità non solo in relazione al taglio routinario della coda, ma anche all'assenza di valutazione del rischio da parte degli allevatori. Il Ministero della Salute ha quindi delineato, attraverso un tavolo tecnico di esperti, un Piano di Azione per la corretta applicazione del D.Lgs 122/2011 e per il miglioramento delle condizioni di benessere nei suini (Ministero della Salute, 2018). Questo Piano ha previsto, nella fase iniziale, l'esecuzione di una valutazione del rischio per la morsicatura della coda nella specie suina nei settori di svezzamento e ingrasso. Il gruppo di lavoro ministeriale ha predisposto una check-list ad hoc per tale valutazione del rischio con la possibilità dell'inserimento online nel sistema ClassyFarm; inoltre al fine di uniformare il giudizio dei valutatori è stato organizzato un corposo programma di formazione a cascata per veterinari e allevatori. Infine, sono state accreditate le Regioni e Istituti Zooprofilattici al monitoraggio dell'inserimento delle valutazioni del rischio in ClassyFarm per il proprio territorio. Entro il 30 marzo del 2019 tutti gli allevatori, con il supporto dei veterinari formati, sono stati tenuti a verificare i fattori di rischio del proprio allevamento attraverso il sistema ClassyFarm e a porre in essere le opportune azioni correttive ove necessario. A partire dal 2020, tutti gli allevatori devono obbligatoriamente accasare piccoli gruppi di suini non caudectomizzati al fine di saggiare le condizioni della propria azienda con i soggetti a rischio (Circolare 2839 del 04/02/2019). Gli accasamenti di questi suini permetteranno di verificare le condizioni di ogni singolo allevamento al fine di perseguire gli eventuali ulteriori miglioramenti strutturali e gestionali necessari.

Con l'intento di favorire il futuro processo di gestione degli animali non caudectomizzati negli allevamenti, il Ministero della Salute ha anche promosso per il 2019 una fase volontaria di accasamento di gruppi non caudectomizzati, sotto la supervisione delle Autorità regionali e degli Istituti Zooprofilattici. Il presente lavoro riporta i risultati preliminari ottenuti in Veneto in relazione all'accasamento volontario di gruppi non caudectomizzati in 6 siti (3 siti di svezzamento e annessi 3 siti di ingrasso).

## **MATERIALI E METODI**

In Veneto hanno aderito al piano volontario tre aziende a ciclo chiuso (A, B e C). In tali allevamenti era stata eseguita una valutazione del rischio di morsicature delle code, con successiva risoluzione dei punti critici rilevati. Le procedure di monitoraggio sono state realizzate sulla base del protocollo indicato nella Circolare 2839 del 04/02/2019. Il protocollo prevede una visita iniziale ( $T_0$ ) al fine di individuare gli ambienti da destinare all'accasamento di suini non caudectomizzati (NC), annotando i tipi di pavimentazione, qualità e quantità di materiali di arricchimento, il tipo e il numero di abbeveratoi, la modalità di alimentazione (ad libitum o razionata). I gruppi NC sono stati affiancati da un gruppo di controllo caudectomizzato (C) nelle stesse condizioni di allevamento (ad eccezione della azienda B, che ha scelto di accasare solo

capi NC). La seconda visita ( $T_1$ ) è stata effettuata 15 giorni dopo l'accasamento durante la fase di svezzamento. La terza visita ( $T_2$ ) è stata effettuata nella settimana precedente il trasferimento nelle strutture di finissaggio, la terza ( $T_3$ ) dopo 2-4 settimane dall'accasamento. L'ultima visita è avvenuta circa un mese prima del carico verso il macello ( $T_4$ ), disponibile solo per l'azienda A. Per entrambi i gruppi C e NC, in ciascuno degli accessi è stato verificato il computo dei capi presenti e verificate le relative densità di stabulazione attraverso misurazione degli spazi disponibili. Per mezzo di rilevatore multigas Dräger X-am 7000 (Dräger® Safety AG & Co. KGaA, Lubeca, Germania) sono stati misurati i livelli di ammoniaca ( $NH_3$ ) ed anidride carbonica ( $CO_2$ ) (dettagli operativi nel Manuale CReNBA, 2018). Sono state registrate sia le lesioni alla coda, con presenza di sanguinamento, gonfiore, escara o perdita di tessuto, che al padiglione auricolare (ferita con sanguinamento e perdita di tessuto). In aggiunta sono stati valutati, attraverso l'osservazione delle animal-based measures, i livelli di pulizia e polverosità degli ambienti e l'indice di interesse per i materiali di arricchimento (dettagli nel Manuale CReNBA, 2018). I capi macellati sono stati osservati post-mortem dopo la divisione in mezzene per le seguenti lesioni con i relativi score dettagliati in letteratura: score code da 0 a 3 (Vom Brocke et al., 2018); perdita completa della coda (grado 4 di Vom Brocke et al., 2018); coda non integra (coda visibilmente accorciata, con terminazione anormale); gonfiore della coda (coda visibilmente gonfia); score lesioni cutanee da 0 a 3 (van Staaveren et al., 2017); lesioni alle orecchie (Maisano et al., 2020); ascessi paravertebrali (presenza/assenza di lesioni purulente in corrispondenza della colonna vertebrale).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### *Valutazione dei fattori ambientali e gestionali*

I valori di pulizia, polverosità e di gas nocivi registrati si sono attestati sempre all'interno di un livello adeguato/ottimale (classificazione su Manuale CReNBA), eccezion fatta per una rilevazione dei livelli di  $CO_2$  nella fase di ingrasso dell'azienda C. La densità animale registrata nelle 3 aziende variava all'aumentare dell'età, oscillando sempre fra il livello adeguato ed ottimale, per quanto riguarda gli animali NC; per gli animali del gruppo C, invece, la densità rilevata ha presentato valori adeguati, con il riscontro di alcune situazioni critiche in soggetti con un peso pari a circa 30 kg e 140 kg. Nel merito dei materiali di arricchimento, tutte le aziende disponevano di catena e di tronchetto di legno morbido, consumato e sostituito di frequente (Fig. 1); nell'azienda A erano inoltre presenti delle rastrelliere con maglie da 3×3 cm da riempire con paglia in corso di casi di morsicatura.

In azienda B, allo svezzamento, e in azienda C, in fase di ingrasso, l'indice di interesse per gli arricchimenti è risultato talora insufficiente in alcuni box, secondo le linee guida del manuale CReNBA. Le insufficienze per l'azienda A sono state rilevate nei soggetti caudectomizzati a 15 giorni dall'entrata in svezzamento e nei soggetti ad un peso di circa 50 kg. Nel resto dei casi le rilevazioni sono risultate sempre adeguate, comprese tra il 18% e il 28%. Questi dati supportano l'idoneità della combinazione legno morbido più catena in termini di efficacia di interesse di utilizzo (Circolare 24555 del 24/09/2019).

### *Lesioni auricolari*

Per la prima azienda, le lesioni auricolari sono state riscontrate maggiormente durante  $T_1$  nel periodo di svezzamento, per poi scomparire del tutto nelle fasi successive. Nell'azienda numero 2 non sono state osservate lesioni auricolari in nessuna delle sessioni di monitoraggio. Per l'azienda numero 3 si è osservata una diminuzione fra  $T_1$  e  $T_2$  in svezzamento, mentre è stato raggiunto il picco massimo nella prima fase di ingrasso ( $T_3$ ). Complessivamente questi risultati sembrano confermare quanto già evidenziato in precedenti studi relativamente all'assenza di connessioni dirette tra il comportamento di morsicatura delle code e delle orecchie. Al contrario,



questi due problemi presentano fenomeni di compensazione, con lesioni più frequenti alle orecchie in soggetti caudectomizzati (Di Martino et al., 2010).

#### *Lesioni alle code*

In accordo con la maggior parte della letteratura, il problema delle morsicature alle code ha origine multifattoriale ed è di difficile risoluzione, vista la presenza di diversi fattori di rischio (Sonoda et al., 2013). Di fatto, anche nel presente studio, che è stato condotto su allevamenti commerciali al di fuori di un contesto di ricerca, nonostante gli accorgimenti per limitare i principali fattori di rischio, sono stati registrati alcuni focolai di morsicatura. Questi focolai sono stati gestiti senza impattare sulla salute generale degli animali e senza perdurare in modo incontrollato nei gruppi sperimentali, pur con frequenza elevata di soggetti con perdita porzioni di coda in fase di macellazione (azienda B). Da segnalare pertanto la necessità, dopo l'evidenziazione di criticità, di migliorare ulteriormente le condizioni di allevamento, in particolare riguardo ai materiali manipolabili nelle corrette combinazioni di complementarietà (Manuale CREnBA, 2018).

Secondo quanto riportato in studi precedenti sul suino pesante italiano (Scollo et al., 2013; Di Martino et al., 2015), le lesioni alla coda presentano tipicamente un picco tra la fine dello svezzamento e l'inizio dell'ingrasso, per diminuire nel periodo successivo (Di Martino et al., 2015). Nel presente studio è stata evidenziata una certa variabilità nel periodo di insorgenza delle problematiche di morsicatura: nell'azienda A sono emersi problemi già a T<sub>1</sub>, con ulteriore aumento a T<sub>2</sub>. Alla prima visita nella fase di ingrasso si è assistito invece a una forte diminuzione della frequenza di riscontro delle lesioni, ulteriormente diminuita un mese prima del carico verso il macello (Tab 1, 2). L'azienda B ha presentato livelli contenuti di lesioni in svezzamento, ma un picco rilevante nella fase iniziale di ingrasso. Nell'azienda C, il picco di lesioni è stato invece evidenziato a fine svezzamento.

**Tabella 1:** monitoraggio di gruppi non caudectomizzati (NC) e caudectomizzati (C) in svezzamento. Media±ES.

**Table 1:** monitoring of undocked (NC) and docked pigs (C) in the weaner phase. Mean±SE.

|                        | Azienda A |       |           |       | Azienda B |            | Azienda C |     |           |            |
|------------------------|-----------|-------|-----------|-------|-----------|------------|-----------|-----|-----------|------------|
|                        | 6-10kg    |       | 20-30kg   |       | 6-10kg    | 20-30kg    | 6-10kg    |     | 20-30kg   |            |
|                        | NC        | C     | NC        | C     | NC        | NC         | NC        | C   | NC        | C          |
| n. osservati           | 283       | 281   | 283       | 281   | 103       | 103        | 243       | 246 | 243       | 246        |
| % lesioni auricolari   | 0         | 0,7   | 3,7       | 1,8   | 0         | 0          | 8,2       | 3,6 | 5,9       | 6,7        |
| % lesioni coda         | 16        | 1     | 23,7      | 1,4   | 0,9       | 2,8        | 8,6       | 0,1 | 27,3      | 2          |
| Temp. (°C)             | 24,5      | 23,8  | 24,2      | 24    | 31,6      | 31,5       | 21,7      |     | 20,4      | 20,9       |
| UR (%)                 | 63,6      | 62,7  | 59,30     | 62    | N.D.      | N.D.       | 68,2      |     | 68,7      | 63,7       |
| NH <sub>3</sub> (ppm)  | 4,6±0,66  |       | 5,6±0,66  |       | 8,6 ±3,48 | 12,3 ±1,45 | 6 ±0,58   |     | 6 ±1,15   | 6,5±1,76   |
| CO <sub>2</sub> (ppm)  | 1433±87,8 |       | 1400 ±173 |       | 1766±33   | 1766 ±88   | 2566 ±290 |     | 5100 ±965 | 5200 ±1195 |
| m <sup>2</sup> /capo   | 0,29±0,01 |       | 0,30±0,01 |       | 0,38±0,01 |            | 0,27±0,02 |     | 0,44±0,1  | 0,3±0,3    |
| % Interesse manipolab. | 23 ±8     | 14 ±5 | 27 ±8     | 20 ±6 | 10±0,1    | 0          | 23±0,1    |     | 11±0,1    | 17±0,1     |

**Tabella 2:** monitoraggio di gruppi non caudectomizzati (NC) e caudectomizzati (C) in ingrasso. Media±ES.

**Table 2:** monitoring of undocked (NC) and docked pigs (C) in the finishing phase. Mean±SE.

|                        | Azienda A |           |           |           | Azienda B | Azienda C |           |
|------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                        | 30-50 kg  |           | 140kg     |           | 30-50 kg  | 30-50 kg  |           |
|                        | NC        | C         | NC        | C         | NC        | NC        | C         |
| % lesioni auricolari   | 0,0       | 0,0       | 0,4       | 0,0       | 0,0       | 14,0      | 7,8       |
| % lesioni coda         | 7,1       | 0,7       | 1,3       | 0,5       | 18,6      | 9,6       | 0,0       |
| Temp. (°C)             | 28        | 32,3      | 24,3      | 24,3      | 34        | 23,5      | 20,5      |
| UR (%)                 | 71,7      | 67,3      | 68,9      | 68,9      | ND        | 75,1      | 71,8      |
| NH <sub>3</sub> (ppm)  | 5,2 ±0,79 | 13±0,82   | 8,5 ±1,34 |           | ND        | 7±1,40    | 5,14±0,63 |
| CO <sub>2</sub> (ppm)  | 1483 ±54  | 1300 ±163 | 2175 ±71  |           | ND        | 4387±72   | 4485±67   |
| m <sup>2</sup> /capo   | 0,54±0,01 | 0,55±0,01 | 1,11±0,01 | 0,85±0,01 | 0,45±0,02 | 0,67±0,04 | 0,53±0,01 |
| % Interesse manipolab. | 28 ±0,006 | 5 ±0,04   | 20±10,5   | 22±2,1    | 21 ±0,05  | 11±0,05   | 4±0,04    |



**Figura 1:** Tronchetto di legno morbido inserito in un contenitore metallico.

**Figure 1:** Soft wooden stump put in a metal container.

#### *Valutazioni al macello*

Negli stabilimenti di macellazione sono stati valutati i soggetti delle aziende A e B, mentre quelli dell'azienda C sono ancora in attesa di essere macellati (Tab. 3). Nell'azienda A, l'80% dei soggetti non presentava lesioni recenti alle code, tuttavia in quasi metà dei soggetti valutati erano riscontrabili tracce di cicatrizzazione e perdita pregressa di tessuto. Altri tipi di lesione (auricolari e ascessi paravertebrali) non sono stati riscontrati. In merito alle lesioni cutanee, la maggior parte dei soggetti presentava carcasse in condizioni ottimali. Per l'azienda B, il 91% di code non presentava lesioni recenti, sebbene nella maggior parte dei soggetti fossero

riscontrabili tracce di pregressa perdita di tessuto. In nessun animale sono state registrate lesioni di tipo 2 e 3. Di tale gruppo, l'1% di soggetti presentava perdita completa della coda. Anche per l'azienda B non sono stati rinvenuti soggetti con lesioni auricolari o paravertebrali. Durante la valutazione della cute è stato riscontrato il 58,9% di score 0, il 24,4% di score 1, il 15,6% di score 2 e il 1,1% di score 3. Vi è da rilevare che solamente una piccola percentuale di soggetti in entrambe le aziende ha presentato lesioni recenti, confermando che il problema morsicature non si manifesta nell'ultimo periodo di ingrasso, mentre l'elevata frequenza di indici di perdita tissutale evidenziano la difficoltà di gestire il compromesso tra coda integra e benessere animale, già evidenziato in Valros e Heinonen (2015). Complessivamente i risultati al macello evidenziano la necessità di migliorare ulteriormente i protocolli di allevamento di soggetti con coda, in quanto queste percentuali non devono ritenersi accettabili. Ad oggi i dati in letteratura scientifica sulla frequenza di lesioni alle code in gruppi NC sono limitati e molto variabili. In uno studio in 6 macelli inglesi la prevalenza di lesioni risultava inferiore al 10% (Hunter et al., 2001), mentre in uno studio analogo in Finlandia i danneggiamenti hanno raggiunto una prevalenza del 35% (Valros et al., 2004).

**Tabella 3:** Punteggio delle lesioni rilevate al macello in soggetti non caudectomizzati.  
**Table 3:** *Lesion Scores of undocked pigs at the slaughterhouse.*

|                         | Azienda A | Azienda B |
|-------------------------|-----------|-----------|
| Score 0 lesioni coda    | 80,4%     | 91,1%     |
| Score 1 lesioni coda    | 16,0%     | 8,9%      |
| Score 2 lesioni coda    | 3,6%      | 0,0%      |
| Score 3 lesioni coda    | 0,0%      | 0,0%      |
| Perdita completa (CL)   | 0,0%      | 1,1%      |
| Gonfiore coda           | 2,2%      | 1,0%      |
| Code non integre        | 48,2%     | 90,0%     |
| Score 0 lesioni cutanee | 86,7%     | 58,9%     |
| Score 1 lesioni cutanee | 11,5%     | 24,4%     |
| Score 2 lesioni cutanee | 1,8%      | 15,6%     |
| Score 3 lesioni cutanee | 0,0%      | 1,1%      |
| Lesioni orecchie        | 0,0%      | 0,0%      |
| Lesioni paravertebrali  | 0,0%      | 0,0%      |

## CONCLUSIONI

Questo studio riporta i risultati preliminari raccolti in aziende che hanno spontaneamente intrapreso nel 2019 il percorso sperimentale richiesto dal Piano di miglioramento del D. Lgs. 122, che risulta invece obbligatorio nel 2020 per tutti gli allevamenti. I dati indicano, in accordo con la letteratura scientifica disponibile, la difficoltà di instaurare un compromesso accettabile tra coda integra e benessere animale, ovvero la necessità di prevenire e migliorare la gestione delle criticità. Per tale approccio, oltre al rispetto rigoroso delle indicazioni normative, è necessario che ogni allevatore sviluppi competenze specifiche in relazione alla sensibilità di osservazione e alla rapidità di intervento. Infine, risulta fondamentale ribadire che ogni allevamento dovrà seguire il proprio percorso, con il supporto tecnico del veterinario aziendale, adoperando soluzioni che vadano, se necessario, oltre il requisito di legge al fine di trovare il corretto equilibrio tra il management e le strutture per allevare suini non caudectomizzati.

## BIBLIOGRAFIA

1. Commissione Europea (2016). Final report of an audit carried out in Italy from 13 November 2017 to 17 November 2017 in order to evaluate member state activities to prevent tail-biting and avoid routine tail-docking of pigs.
2. Commissione Europea (2016). 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.
3. CREnBA (2018). Linee guida per la prevenzione del taglio della coda nell'allevamento suino dallo svezzamento all'ingrasso. <http://www.classyfarm.it/wp-content/uploads/sites/4/2018/08/Manuale-linee-guida-rischio-taglio-coda.pdf>
4. Ministero della Salute (2019). Decreto Legislativo 7 luglio 2011, n. 122 Attuazione della direttiva 2008/120/CE che stabilisce le norme minime per la protezione dei suini.
5. Di Martino G., Bonfanti L., Capello K., Patregnani T., Stefani A., Schiavon E., Gottardo F. (2010). Effetti della presenza della coda durante la fase di svezzamento nello sviluppo di lesioni in suinetti maschi e femmine. 36° Congresso SIPAS, Montichiari (BS), 25-26 Marzo 2010.
6. Di Martino G., Scollo A., Gottardo F., Stefani A.L., Schiavon E., Capello K., Marangon S., Bonfanti L. (2015). The effect of tail docking on the welfare of pigs housed under challenging conditions. *Livestock Science* 173, 78-86.
7. EFSA (2007). Scientific report on the risk associated with tail biting in pigs and possible means to reduce the needs to tail docking considering the different housing and husbandry system. *EFSA Journal* 611, 4-13.
8. Hunter E.J., Jones T.A., Guise H.J., Penny R.H.C., Hoste S. (2001). The Relationship Between Tail Biting in Pigs, Docking Procedure and Other Management Practices. *The Veterinary Journal* 161, 72-79.
9. Maisano A., Luini, M., Vitale N., Rota Nodari S., Scali F., Alborali G., Vezzoli, F. (2020). Animal-based measures on fattening heavy pigs at the slaughterhouse and the association with animal welfare at the farm level: A preliminary study. *Animal* 14, 108-118.
10. Ministero della Salute (2019a). Circolare del Ministero della Salute 2839 del 04/02/2019. Chiarimenti sul Piano di azione nazionale per il miglioramento dell'applicazione del Decreto Legislativo 122/2011 che stabilisce norme minime per la protezione dei suini.
11. Ministero della Salute (2019b). Circolare del Ministero della Salute 24555 del 24/09/2019. Piano nazionale di miglioramento dell'applicazione del d.lgs. 122/2011 – chiarimenti sulle modalità di attuazione.
12. Scollo A., Di Martino G., Bonfanti L., Stefani A.L., Schiavon E., Marangon S., Gottardo F. (2013). Tail docking and the rearing of heavy pigs: the role played by gender and the presence of straw in the control of tail biting. Blood parameters, behaviour and skin lesions. *Research in Veterinary Science* 95, 825-830.
13. Sonoda L. T., Fels M., Oczak M., Vranken E., Ismayilova G., Guarino M., Viazzi S., Bahr C., Berckmans D., Hartung J. (2013). Tail biting in pigs--causes and management intervention strategies to reduce the behavioural disorder. A review. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 126, 104-112.
14. Valros A., Ahlström S., Rintala H., Häkkinen T., Saloniemi H. (2004). The prevalence of tail damage in slaughter pigs in Finland and associations to carcass condemnations. *Acta Agricultura Scandinavica A – Animal Science* 54, 213-219.
15. Valros A., Heinonen M., (2015). Save the pig tail. *Porcine Health Management* 1, 1-7.
16. Van Staaveren N., Doyle B., Manzanilla, E.G., Calderón Díaz J.A., Hanlon A, Boyle L.A. (2017). Validation of carcass lesions as indicators for on-farm health and welfare of

- pigs. *Journal of Animal Science* 95, 1528-1536.
17. Velarde A., Cruz J., Gispert M., Carrión D., de la Torre J.R., Diestre A., Manteca X. (2007). Aversion to carbon dioxide stunning in pigs: effect of carbon dioxide concentration and halothane genotype, *Animal Welfare* 16, 513-522.
  18. vom Brocke A.L, Karnholz C., Madey-Rindermann D., Gauly M., Leeb C., Winckler C., Schrader L., Dippel S. (2018). Tail lesions in fattening pigs: relationships with postmortem meat inspection and influence of a tail biting management tool. *Animal* 13, 835-844.
  19. Wallgren T., Lundeheim N., Wallenbeck A., Westin R. and Gunnarsson S. (2019). Rearing Pigs with Intact Tails-Experiences and Practical Solutions in Sweden. *Animals* 9, 812-826.

# EFFETTO DEL BETA-(1,3)-GLUCANI DERIVATO DALLE ALGHE SULLA RISPOSTA UMORALE ALLA VACCINAZIONE PRRSV NEI SUINI SVEZZATI

## EFFECT OF ALGAE DERIVED BETA-(1,3)-GLUCAN ON HUMORAL RESPONSE TO PRRSV VACCINATION IN WEANED PIGS

SMEETS N.<sup>1</sup>, VAN HAMME V.<sup>1</sup>, GONZALEZ SANCHEZ D.<sup>1</sup>, MATTUZZI S.<sup>1</sup>,  
M. MATEU E.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kemin Europa NV

<sup>2</sup>Dept Animal Health and Anatomy, Universitat Autònoma de Barcelona

**Parole chiave:** Beta-Glucan, Aleta™, suinetti svezzati, vaccinazione, PRRS

**Key Words:** Beta-Glucan, Aleta™, weaned piglets, vaccination, PRRS

### RIASSUNTO

La sindrome riproduttiva e respiratoria dei suini (PRRS) è una malattia che colpisce i suini in tutto il mondo e ha un enorme impatto economico. La vaccinazione è lo strumento più importante per controllare la malattia, quindi qualsiasi strumento che possa sostenere questa vaccinazione è benvenuto. Studi precedenti in altre specie animali hanno dimostrato che beta-(1,3)-glucani, derivati da alghe, stanno aumentando la risposta umorale a diversi vaccini. L'obiettivo di questo studio era quello di verificare se la somministrazione di questi beta-(1,3)-glucani nel mangime ai suinetti svezzati porta ad una risposta umorale più elevata dopo la vaccinazione PRRSV. La prova è stata eseguita presso l'azienda agricola dell'università di Barcellona (Spagna) e consisteva in 3 gruppi di 17 suinetti ciascuno, di 35 giorni di età all'inizio. Gli animali sono stati alimentati con diete contenenti 0, 100 e 200 g/t di beta-(1,3)-glucani (Aleta™, Kemin) per 14 giorni prima della vaccinazione: gruppo 0, 1 e 2 rispettivamente. Al 14° giorno di prova, tutti i suini hanno ricevuto una dose di un vaccino vivo modificato (Porcilis PRRS, MSD animal health). I titoli anticorpali sono stati misurati a 14 e 21 giorni dopo la vaccinazione, espressi come rapporto tra campione e positivo (S/P). I suinetti del gruppo 1 e 2 hanno mostrato livelli significativamente più elevati di anticorpi specifici PRRSV (il rapporto s/p è stato rispettivamente di 0,91 e 0,90) e una maggiore proporzione di animali sierconvertiti (75% e 70,6% rispettivamente) a 14 giorni dalla vaccinazione, rispetto agli animali non supportati (47,1% di animali sierconvertiti con un rapporto s/p medio di 0,52). A 21 giorni dalla vaccinazione, sia il gruppo 1 che il gruppo 2 hanno mostrato livelli numericamente più elevati di anticorpi specifici (il rapporto s/p è stato rispettivamente di 1,170 e 1,011) rispetto al gruppo 0 (rapporto s/p = 0,991). Più animali sierconvertiti in entrambi i gruppi 1 (93%) e 2 (94%), rispetto al gruppo 0 (76%). I risultati di questo studio dimostrano che l'integrazione di beta-(1,3)-glucani può essere utilizzata per migliorare e accelerare la risposta umorale alla vaccinazione PRRS nei suini svezzati.

### ABSTRACT

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is a disease which is affecting pigs worldwide and has a huge economic impact. Vaccination is the most important tool to control the disease, therefore, any tool that could support this vaccination is welcome. Previous studies in other animal species have shown that algae derived beta-(1,3)-glucan,

is increasing humoral response to several vaccines. The aim of this trial was to test if the administration of those beta-(1,3)-glucans in feed to weaned piglets results in a higher humoral response after PRRSV vaccination. The trial was performed at the farm of the university of Barcelona (Spain) and consisted of 3 groups of 17 piglets each, aged 35 days at start. Animals were fed diets containing 0, 100, and 200 g/t beta-(1,3)-glucans (Aleta™, Kemin) for 14 days before vaccination: group 0, 1 and 2 respectively. At day 14 of the trial, all pigs received a dose of a modified live vaccine (Porcilis PRRS, MSD animal health). Antibody titers were measured at 14 and 21 days after vaccination, expressed as sample to positive (S/P) ratio. Piglets of group 1 and 2 showed significant higher levels of specific PRRSV antibodies (s/p ratio was 0.91 and 0.90 respectively) and increased proportion of seroconverting animals (75% and 70.6% respectively) at 14 days after vaccination, compared to the non-supplemented animals (47.1% of animals seroconverting with an average s/p ratio of 0.52). At 21 days after vaccination, both group 1 and 2 showed numerically higher levels of specific antibodies (s/p ratios were 1.170 and 1.011 respectively) compared to group 0 (s/p-ratio =0.991). More animals seroconverted in both group 1 (93%) and 2 (94%), compared to group 0 (76%). Findings from this trial show that beta-(1,3)-glucan supplementation can be used to improve and accelerate humoral response to PRRS vaccination in weaned pigs.

## INTRODUZIONE

Studi precedenti in altre specie animali hanno dimostrato che Aleta™, un beta-(1,3)-glucano derivato dalle alghe, usato nei mangimi, aumenta la risposta in studi sierologici del titolo anticorpale negli animali osservati e in associazione a diversi vaccini. Di conseguenza, l'obiettivo di questo studio era di valutare l'effetto dell'Aleta™ sulla risposta anticorpale alla vaccinazione PRRS nei suinetti.

## MATERIALE E METODI

Questa prova è stata eseguita presso il dipartimento di Salute Animale e Anatomia dell'Università di Barcellona. I suinetti utilizzati nello studio sono stati Landrace x Large White ottenuti da un allevamento privo di PRRS, dove i suinetti erano svezzati a 4 settimane di età. Per lo studio, 51 suinetti (4 settimane di età) sono stati selezionati a caso e distribuiti in 3 box, distribuendo 17 animali per ognuno. Ogni box è stato diviso in due recinti dove sono stati assegnati 7-8 animali ciascuno. Per i primi 7 giorni, gli animali hanno vissuto un periodo di adattamento al nuovo ambiente e sono stati alimentati con un pre-starter. Dopo il periodo di acclimatazione, agli animali è stato somministrato Aleta™ in un mangime starter, a 100 g/T (Aleta 100) e 200 g/T (Aleta 200), ad eccezione del gruppo di controllo. L'Aleta™ è stato somministrato per 14 giorni. Gli animali sono stati vaccinati immediatamente dopo il periodo di 14 giorni di somministrazione di Aleta™ con Porcilis PRRS Modified live vaccine (MSD Animal Health) intramuscolare nel collo. Il sangue è stato prelevato per la sierologia a 14 e a 21 giorni dopo la vaccinazione. I titoli anticorpali sono stati misurati mediante impiego di Kit ELISA PRRS ed espressi come rapporti S/P:

$$\frac{\text{Mean of Test Sample} - \text{Mean of negative control}}{\text{Mean of Positive control} - \text{Mean of negative control}} = \text{S/P}$$

I suinetti sono stati pesati alla fine della prova (giorno 42) per verificare se non ci fossero effetti negativi sulla crescita dovuti all'uso di un immunomodulatore.



## ALIMENTAZIONE E SOMMINISTRAZIONE DEL PRODOTTO IN ESAME

All'arrivo, e per i primi 7 giorni gli animali sono stati alimentati con un mangime di adattamento pre-starter (Made by Pinsos Molinet, produttore di mangime registrato aESP08100118; rif. F21Q2391500S, lotto: ZA80219A13) dopo la formulazione del Dr. David Solà presso il Servizio di Nutrizione Animale, Dipartimento di Scienze Animali e Alimentari, UAB). Gli ingredienti del mangime pre-starter e starter sono stati: soia tostata, lattosio, siero, glicerina, canna da zucchero, farina di pesce, farina di uova, olio di soia, olio di cocco, olio di palma, fosfato di calcio e carbonato di calcio. Dopo il periodo di 7 giorni di acclimatazione, agli animali sono stati somministrati: durante il primo periodo un alimento pre starter, seguito da starter e il trattamento. Il periodo di prova è stato di 14 giorni, con somministrazione ad libitum.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Prima della vaccinazione, tutti gli animali erano sieronegativi per la PRRS. A 14 giorni dalla vaccinazione, in entrambi i gruppi trattati più del 70% degli animali aveva sviluppato anticorpi specifici per la PRRS (75% in Aleta™ 100 e 70,6% in Aleta™ 200). Al contrario, solo il 47,1% degli animali di controllo ha mostrato anticorpi PRRS. Per quanto riguarda i titoli anticorpali, misurati come rapporto S/P, il valore medio S/P per il gruppo Aleta 200 a 14 giorni dopo la vaccinazione era di 0,91 e 0,90 per il gruppo Aleta™ 100, rispetto a solo 0,52 per il gruppo di controllo. Di conseguenza, quando tutti gli animali trattati sono stati confrontati con il gruppo di controllo, le differenze di S/P erano chiaramente significative a 14 giorni dopo la vaccinazione ( $p=0,026$ , Kruskal-Wallis). A 21 dopo la vaccinazione, i rapporti S/P sono stati aumentati numericamente in entrambi i gruppi Aleta™ rispetto al gruppo di controllo. L'aggiunta di Aleta al mangime è sicura e non ha alcun effetto negativo sulle prestazioni in quanto ha aumentato numericamente il peso corporeo finale (40,14 kg per il gruppo di controllo, 40,66 e 42,55 per il gruppo di Aleta 100 e 200 rispettivamente).

### Giorno 0 dopo la vaccinazione (NA = non applicabile)

|         | Controllo |          |         | 100 gr/t |          |         | 200 gr/t |          |
|---------|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
|         | S/P       | %        |         | S/P      | %        |         | S/P      | %        |
|         | ratio     | positive |         | ratio    | positive |         | ratio    | positive |
| Average | 0.142     | 0        | Average | 0.154    | NA       | Average | 0.174    | 0        |
| St. dev | 0.046     | NA       | St. dev | 0.035    | NA       | St. dev | 0.021    | NA       |

### 14° giorno dopo la vaccinazione (NA = non applicabile)

|         | Controllo |          |         | 100 gr/t |          |         | 200 gr/t |          |
|---------|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
|         | S/P       | %        |         | S/P      | %        |         | S/P      | %        |
|         | ratio     | positive |         | ratio    | positive |         | ratio    | positive |
| Average | 0.518     | 47,1     | Average | 0.897    | 75       | Average | 0.911    | 70,6     |
| St. dev | 0.447     | NA       | St. dev | 0.630    | NA       | St. dev | 0.596    | NA       |

### 21° giorno dopo la vaccinazione (NA = non si applica)

|         | Controllo |          |         | 100 gr/t |          |         | 200 gr/t |          |
|---------|-----------|----------|---------|----------|----------|---------|----------|----------|
|         | S/P       | %        |         | S/P      | %        |         | S/P      | %        |
|         | ratio     | positive |         | ratio    | positive |         | ratio    | positive |
| Average | 0.911     | 76       | Average | 1.170    | 93       | Average | 1.011    | 94       |
| St. dev | 0.591     | NA       | St. dev | 0.635    | NA       | St. dev | 0.427    | NA       |

## CONCLUSIONE

In conclusione, la somministrazione di Aleta™ a tutte le dosi testate ha aumentato la produzione di anticorpi anti-PRRS da parte del suinetto dopo la vaccinazione. Inoltre, nei gruppi di Aleta™ è stata osservata una maggiore proporzione di animali che rispondono ai test in età precoce. La somministrazione di Aleta™ è sicura in quanto non è stato osservato alcun impatto sul peso corporeo. Di conseguenza la presenza di Aleta™ nel mangime, in combinazione con la vaccinazione, costituisce una strategia per un allevamento suino che voglia essere maggiormente protetto da PRRS, anche in giovane età.

## BIBLIOGRAFIA

1. Li, J. and Murtaugh, M.P. 2015. Functional analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus N-glycans in infection of permissive cells. *Virology*. 477:82-88.
2. Linhares DCL, Johnson C, Morrison RB 2015. Economic Analysis of Vaccination Strategies for PRRS Control. Leung FC, ed. *PLoS ONE*. (Abstr).
3. Mao, X. F., X. S. Piao, C. H. Lai, D. F. Li, J. J. Xing and B. L. Shi. 2005. Effects of  $\beta$ -glucan obtained from the Chinese herb *Astragalus membranaceus* and lipopolysaccharide challenge on performance, immunological, adrenal, and somatotrophic responses of weanling pigs. *J. Anim. Sci.* 83:2775-2782.
4. Oleksiewicz MB, Nielsen J. 1999. Effect of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) on alveolar lung macrophage survival and function. *Vet Microbiol.* 66:15-27.
5. Sonck E, Stuyven E, Goddeeris B, Cox E. 2010. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol.* 135:199-207.
6. Xiao Z, Trincado CA, Murtaugh MP. 2004. Beta-glucan enhancement of T cell IFN-gamma response in swine. *Vet Immunol Immunopathol.* 102:315-20.

# SVEZZAMENTO SOSTENIBILE DEI SUINETTI CON LIVELLI CORRETTI DI ZINCO

## SUSTAINABLE PIGLETS WEANING WITH CORRECT ZINC LEVELS

KIRWAN S., TÓTH S., VAN HAMME V., MATTUZZI S., DI BENEDETTO M.

*Kemin Agrifood Europa*

**Parole chiave:** Ossido di zinco, suinetti, diarrea, additivi

**Key words:** Zinc oxide, piglets, dhiarroea

### RIASSUNTO

L'ossido di zinco a livello medicinale è già vietato in alcuni paesi europei e sarà vietato in tutti entro il 2022. La revisione della letteratura mostra chiaramente, a causa delle molteplici modalità di azione che l'ossido di zinco possiede, che, per tutelare l'integrità intestinale ed il microbioma, non può essere facilmente sostituito da un singolo componente alternativo. Poiché il livello di challenge in campo è drasticamente diverso da quello degli istituti di ricerca, ogni alternativa dovrebbe essere convalidata sul campo. Questo articolo riguarda entrambi, la revisione degli effetti degli elevati livelli di ossido di zinco e la convalida di una potenziale alternativa in condizioni di campo reali.

### ABSTRACT

In many European countries zinc oxide (ZnO) is licensed for pharmaceutical use up to 2,500 mg/kg zinc for 14 days post-weaning, mainly to prevent diarrhoea. The benefits are maintaining essential zinc supply after weaning, improved gut integrity via tight-junctions and reduced pathogen pressure. Despite the increased need for such tools, with decreased anti-microbial and copper use, many countries are in the process of banning this application. In this trial a cost neutral alternative was tested. A slow-release butyrate was used to ensure gut integrity during the critical period after weaning. To support the microbiome a probiotic was selected to minimise the risk posed by clostridia. Organic acids have been shown to be effective against *E.coli*, for this reason encapsulated acids were included in the alternative. The test was repeated twice.

In the pre-starter diet both groups showed similar results. No diseases or diarrhoea requiring treatment was observed. In the starter phase after weaning, significant differences could be observed. The difference in mortality (18 vs 2 head) was mainly due to culling for ear necrosis. This might be linked to better absorption of minerals from the diet in the absence of zinc oxide and better gastro-intestinal status. In both trials the alternative group was heavier at the end of the phase compared to the control groups (4.8 and 3.6 kg respectively). The zinc oxide alternative showed significantly higher daily feed intake in both groups, possibly due to better palatability due to the lack of zinc oxide supplementation. On top of the higher feed intake FCR was markedly improved by the replacement of ZnO in the diet.

Economically the exchange was cost neutral from the additive point of view. From the value of the piglets for sales, the alternatives had an economic benefit of € 7 and € 8.70 respectively.

### INTRODUZIONE

In ogni discussione è fondamentale distinguere il bisogno fisiologico di zinco come oligoelemento dall'uso medicinale di ossido di zinco. Quest'ultimo ha gravi conseguenze

ecologiche sull'aumento dei livelli di zinco nell'ambiente. Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che alti livelli di ossido di zinco possono incrementare la resistenza microbica agli antibiotici, e questo costituisce un motivo ancora più grave di preoccupazione. Pertanto, considerando anche l'imminente divieto dell'ossido di zinco terapeutico, la definizione di alternative efficaci è essenziale.

Lo zinco è un oligoelemento essenziale, raccomandato dall'NRC a 46,6 mg di zinco al giorno nei suinetti dopo lo svezzamento. Il livello massimo di zinco consentito in EU dal 2022 in poi, pari a 150 ppm nel mangime post-svezzamento, mira a soddisfare questa esigenza di zinco. Facendo riferimento alle biodisponibilità più elevate pubblicate delle fonti di zinco organico (91 %) con gli studi sui polli da carne, è possibile calcolare un'assunzione di mangimi necessaria per soddisfare la necessità di zinco. Per soddisfare i livelli raccomandati da NRC, i suinetti dovrebbero consumare 341 g di cibo al giorno immediatamente dopo lo svezzamento. Questo numero viene in genere raggiunto solo una quindicina di giorni dopo lo svezzamento, quindi il bisogno fisiologico di zinco non può essere soddisfatto entro tali limiti. Questa situazione è resa più critica in quanto gli studi sui suinetti hanno dimostrato che la mancanza di zinco può indurre diarrea e quindi a perdite significative di zinco. Inoltre, la mancanza di zinco e altri minerali può contribuire allo sviluppo del cannibalismo.

La biodisponibilità di zinco dall'ossido è in genere solo del 20 %. Il suo effetto principale è dovuto all'elevata inclusione (fino a 2500 ppm di zinco) e agli effetti all'interno del tratto gastro-intestinale. Quando si considera una sostituzione di queste inclusioni non fisiologiche è importante considerare gli effetti che l'ossido di zinco ha nel tratto gastro-intestinale del maiale appena svezzato.

Il primo effetto che si può osservare quando si include l'ossido di zinco nelle diete allo svezzamento è una riduzione dell'assunzione di mangimi. Questo effetto è negativo sia per la salute gastro intestinale che per la crescita dei suinetti. Qualsiasi sostituzione dovrebbe quindi mirare a non avere, o almeno a ridurre l'impatto negativo sull'assunzione di mangimi allo svezzamento.

Lo zinco svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'integrità intestinale e delle giunzioni intestinali. Ciò è fondamentale per lo svezzamento in quanto i potenziali patogeni (ad esempio E.coli) dipendono dalla traslocazione per causare gravi malattie nei giovani animali. Anche senza la presenza di potenziali agenti patogeni una compromessa integrità intestinale rende l'assorbimento di nutrienti vitali meno efficiente. Un'alternativa agli alti livelli di zinco sono i butirrati(1). A differenza dell'ossido di zinco, i butirrati vengono assorbiti in modo molto efficiente, quindi è importante utilizzare prodotti con un rilascio lento per avere un effetto lungo il tratto intestinale (4).

Non vi è alcun chiaro consenso sull'effetto che alti livelli di ossido di zinco hanno sul microbioma intestinale. Un recente studio Yu, et al. (6) suggerisce che ha un effetto limitato sul microbioma complessivo., Højberg et al. (2) ha riscontrato un aumento di potenziali patogeni come E.coli collegati alla diarrea da svezzamento. L'effetto modulante su E. coli non è stato dimostrato in alcun lavoro scientifico.

Due effetti delle soluzioni alternative sono auspicabili riguardo al microbioma. Una modulazione della crescita microbica complessiva che beneficia di nutrienti pervenuti non digeriti nell'intestino crasso (E. coli, Clostridia spp.) e una promozione della flora benefica come Lactobacilli e Bifidobacteria. Gli acidi organici a lento rilascio sono efficaci nella modulazione complessiva della flora gram-negativa, oltre a pre o probiotici efficaci nel promuovere la parte benefica del microbioma gram-positivo. Alcuni probiotici del genere Bacillus sono capaci di produrre molecole bifidogeniche che promuovono, per esempio, Lactobacilli (3).

Lo zinco a dosaggio terapeutico ha un effetto limitato sull'immunità. Tuttavia, nei suini e negli esseri umani l'effetto dannoso anche di una leggera carenza di zinco sulla risposta immunitaria è documentato. L'ossido di zinco ad alti livelli potrebbe aver coperto il potenziale divario di approvvigionamento per quanto riguarda l'immunità. Quando si rimuove l'ossido di zinco, la risposta immunitaria dei suinetti potrebbe necessitare un supporto. Idealmente questo dovrebbe provenire dalla scrofa tramite l'immunità passiva, ma anche solo fornire (1.3) beta-glucani al suinetto può aiutare nella maturazione del sistema immunitario (5).

## MATERIALI E METODI

La prova è stata condotta in un allevamento sperimentale in Ungheria. Sono state utilizzate diete commerciali esistenti. Le diete dei suinetti post-svezzamento (all'età di 26 giorni) consistevano in un pre-starter (da circa 6, 2 - 7,5 kg di peso per 15 giorni) ed uno starter (da una media di 10-11 kg di peso e per 26 giorni), lo svezzamento è stato effettuato a 26 giorni. Lo studio ha utilizzato in totale 332 suinetti di ambo i sessi, ripetuto due volte con protocolli uguali per l'ossido di zinco (2500mg/kg) e gruppi di prova.

Il primo test (prova 1) è stato eseguito con 160 suinetti, il secondo (prova 2) con 172 suinetti.



**Figura 1** Schema di sostituzione dell'ossido di zinco nelle diete pre-starter e starter.

**Figure 1** Zinc oxide substitution scheme in pre-starter and starter diets

Nelle diete di prova è stata effettuata una sostituzione totale dell'ossido di zinco dosato a 3 kg/t (Figura 1). La sostituzione è stata neutrale dal punto di vista dei costi.

Nelle diete pre-starter in prova è stata effettuata una sostituzione parziale di 3 kg/tonnellata di acidi organici liberi con 5 kg/tonnellata di mangime di acidi organici protetti. Per supportare il microbioma allo svezzamento è stato inserito un probiotico a base di *Bacillus subtilis* (PB6 - ATCC PTA-6737) a 2x10<sup>8</sup> CFU/kg di mangime. Infine, è stato inserito un sale di calcio dell'ac. Butirrico a lento rilascio alla dose di 1,5kg/tonnellata di mangime. Il mangime pre-starter è stato medicato con Amoxicillina (400 mg/kg) e Colistina (120 mg/kg). Questo protocollo terapeutico non è stato cambiato nei gruppi in prova, in quanto lo scopo della sperimentazione era solo quello di sostituire l'ossido di zinco, non di rimuovere gli antibiotici. Nelle diete starter in prova è stata effettuata una sostituzione totale dell'ossido di zinco nonché degli acidi organici liberi (Figura 1). Il sale di calcio dell'ac. Butirrico a lento rilascio è stato inserito a 1 kg / tonnellata di mangime. Inoltre, è stata effettuata una sostituzione completa di 3 kg/tonnellata di mangime di acidi organici .

liberi con 4 kg/tonnellata di mangime di acidi organici protetti. Anche nel mangime starter in prova è stato utilizzato un probiotico a base di *Bacillus subtilis* (PB6 - ATCC PTA-6737) a 2x10<sup>8</sup> CFU/kg di mangime. Le diete starter controllo e prova non contenevano antibiotici.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

In tutti i gruppi, inclusi quelli in cui è stato sostituito l'ossido di zinco, non si sono verificati episodi di diarrea. (Tabella 1)

| Controllo                                                |                 |             | Trattamento     |             |
|----------------------------------------------------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|
|                                                          | Prova 1         |             | Prova 2         |             |
|                                                          | Ossido di zinco | Alternativa | Ossido di zinco | Alternativa |
| Numero iniziale animali                                  | 80              | 80          | 86              | 86          |
| Peso medio iniziale (kg)                                 | 6,23            | 6,21        | 7,46            | 7,25        |
| Morti e scarti (n°)                                      | 5               | 2           | 13              | 1           |
| Peso medio finale (kg)                                   | 19,5            | 24,3        | 22,4            | 26          |
| ADG g/day                                                | 313             | 435         | 347             | 466         |
| Ingestione mangime (g/capo/giorno)                       | 463             | 572         | 524             | 610         |
| FCR kg/kg                                                | 1,48            | 1,32        | 1,51            | 1,31        |
| Costo totale alimentazione (mangime 0.36 €/kg)           | 419             | 552         | 518             | 636         |
| Valore totale suinetti (€1.52 per kg)                    | 2224            | 2880        | 2490            | 3356        |
| Beneficio economico per suinetto vs. Ossido di zinco (€) | 0               | 6,91        | 0               | 8,70        |

**Tabella 1** Parametri di performance, mortalità ed economici

**Table 1** Key performance parameters, mortalities and economics

Gli accrescimenti ponderali giornalieri sono risultati superiori nei gruppi in prova, con differenze pari a g 122 e g 119 nei confronti dei gruppi ossido di zinco, rispettivamente nella prova 1 e 2. L'ingestione di mangime ha seguito lo stesso trend, con incrementi pari a g 109 e g 86 rispettivamente nei due gruppi in prova. Nonostante l'aumento dell'ingestione, l'indice di conversione è migliorato in maniera significativa nei gruppi in prova, rispettivamente di 16 e 20 punti. Inoltre, nei gruppi di prova si è osservata una diminuzione della necrosi dell'orecchio grave nei gruppi in prova, soprattutto nella prova 2, con conseguente riduzione del numero dei morti e degli scarti.

Da un punto di vista scientifico, diverse questioni devono essere studiate in modo più dettagliato di quanto sia stato possibile in questo studio, come l'impatto della rimozione del dell'ossido di zinco sull'assorbimento di macro e oligominerali critici e l'integrità intestinale generale.

In generale, il miglioramento dell'accrescimento può essere riferito all'aumento dell'ingestione alimentare, probabilmente a causa della migliore appetibilità del mangime senza ossido di zinco. Il miglioramento dell'efficienza alimentare, così come la riduzione della necrosi dell'orecchio potrebbe essere collegata a un migliore assorbimento dei nutrienti dalla dieta in assenza di ossido di zinco e a un migliore benessere gastro-intestinale.

Dal punto di vista dei costi l'utilizzo di soluzioni alternative ha comportato un miglioramento pari a 6,91 e 8,70 €/capo rispettivamente nella prima e nella seconda prova.

## CONCLUSIONI

Gli effetti dell'ossido di zinco sulla prevenzione della diarrea potrebbero essere sostituiti con misure alternative, basate su additivi a minor impatto ambientale e permesse a livello legislativo anche dopo il bando dell'uso terapeutico dell'ossido di zinco. Inoltre, gli additivi utilizzati per sostituire l'ossido di zinco hanno assicurato eguale efficacia nel controllo delle diarree ed assicurato migliori performance a costi comparabili.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adams, C. Nutrition-based health in animal production (2006). *Nutr. Res. Rev.*, 19(1), pp. 79-89.
2. Højberg, O., Canibe, N., Damgaard Poulsen, H., Skou Hedemann and M., Borg Jensen, B. (2005) Influence of Dietary Zinc Oxide and Copper Sulfate on the Gastrointestinal Ecosystem in Newly Weaned Piglets. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (5) 2267-2277.
3. Ozone, Y., Inouea, A., Shiraishia, H., Hamashimaa, K., Masudab, K., Shiojimab Masanori, S. (2002) Purification and characterization of 3,3-dihydroxyazetidine from culture medium of *Bacillus mesentericus* and *B. subtilis*. *Jour. Microbiol. Meth.* 50:1, pp 91-95
4. Smith, D.J., Barri, A., Herges, G., Hahn, J., Yersin, A.G., Jourdan, A. (2012) In vitro dissolution and in vivo absorption of calcium [1-(14)c] butyrate in free or protected forms. *Jour. Agric. Food Chemistry* 60, pp. 3151-7.
5. Van Hamme, V. and Smeets, N. (2019) Dietary algal beta-(1.3)-glucan modulating inflammation and cell mediated immune responses in piglets through their mother sow. (In press)
6. Yu, T., Zhu, C., Chen, S., Gao, L., Lv, H., Feng, R., Zhu, Q., Xu, J., Chen, Z. and Jiang, Z. (2017) Dietary High Zinc Oxide Modulates the Microbiome of Ileum and Colon in Weaned Piglets. *Frontiers in Microbiol.* 8:825





# RILIEVI ECOGRAFICI E PATOLOGICI IN SUINI AFFETTI DA POLMONITE

## ***PNEUMONIA IN PIGS: ULTRASOUND VS PATHOLOGICAL FINDINGS***

TOSI U.<sup>1</sup>, DE ANGELIS U.<sup>1</sup>, GABRIELLI L.<sup>2</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria,  
Località Piano d'Accio, 64100, Teramo, Italia*

*<sup>2</sup>Medico Veterinario, Libero Professionista, Offida, Ascoli Piceno, Italia*

**Parole chiave:** polmonite, lesioni, ecografia toracica

**Keywords:** pneumonia, pathology, thoracic ultrasonography

### **RIASSUNTO**

L'ecografia toracica è uno strumento diagnostico sempre più utilizzato in medicina umana e veterinaria. Tuttavia, per quanto a nostra conoscenza, pochissimi dati sono attualmente disponibili in letteratura riguardo la sua applicazione nella specie suina in condizioni di campo. Il presente studio si è posto l'obiettivo di valutare l'utilità e la fattibilità dell'ecografia toracica in suini affetti da lesioni riferibili a polmonite enzootica. A tal fine, sono state eseguite indagini ecografiche su polmoni, cadaveri, suini vivi sani ed affetti da sindrome respiratoria. Complessivamente, i risultati ottenuti indicano che l'ecografia toracica è uno strumento efficace per distinguere il parenchima polmonare sano da quello affetto da polmonite. Infatti, le lesioni riferibili a polmonite enzootica mostrano un aspetto ecografico facilmente riconoscibile. In conclusione, riteniamo che l'ecografia toracica potrebbe essere di utile ausilio nella pratica clinica suinatra, integrando i dati forniti da altri strumenti diagnostici (necroscopici, sierologici, microbiologici), per una gestione più precisa e razionale della patologia respiratoria del suino.

### **ABSTRACT**

Thoracic ultrasonography has been increasingly utilized as a diagnostic tool in human and veterinary medicine. However, to the best of our knowledge, very few data are currently available about its application in pigs under field conditions. The present study aimed to evaluate the usefulness and the feasibility of thoracic ultrasonography in pigs affected by enzootic pneumonia-like lesions. Ultrasound investigations were performed on lungs, carcasses, healthy and diseased live pigs. Overall, results indicate that ultrasonography is effective to discriminate between healthy and diseased lungs, enzootic pneumonia-like lesions showing an easily recognizable echogenic texture. In conclusion, thoracic ultrasonography could be useful for the clinic appraisal of pig herds. In our opinion, data resulting from thoracic ultrasonography could integrate, not replace other diagnostic tools (necropsy, serological and microbiological investigations), aiming to manage respiratory diseases in a more precise and rational manner.

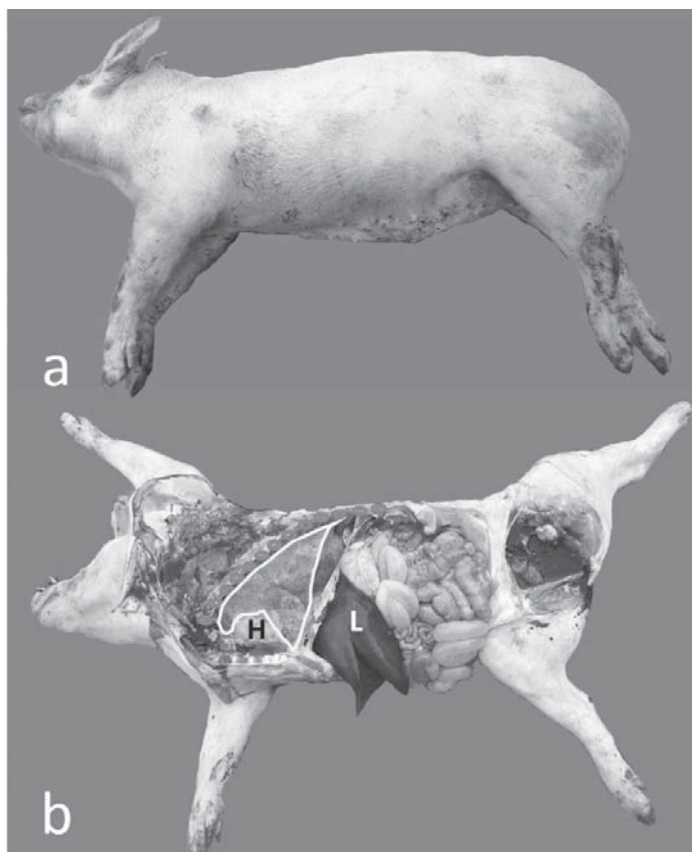
### **INTRODUZIONE**

Le malattie respiratorie sono fra le più comuni ed importanti problematiche sanitarie della suinicoltura moderna. Il loro impatto è piuttosto variabile e risulta dalla complessa interazione fra suini, fattori ambientali ed agenti patogeni. Ad ogni modo, le malattie respiratorie sono universalmente riconosciute come le principali cause di perdite economiche, sia dirette (aumento del tasso di mortalità, ridotte prestazioni zootecniche) sia indirette (spese medico-veterinarie). L'eziologia delle malattie respiratorie del suino è complessa e tipicamente multi-

fattoriale; ciò giustifica l'utilizzo della definizione "complesso delle malattie respiratorie del suino" (*Porcine RespiratoryDiseaseComplex*", PRDC), ad indicare l'insieme delle malattie respiratorie dei suini in accrescimento/ingrasso (1, 2).

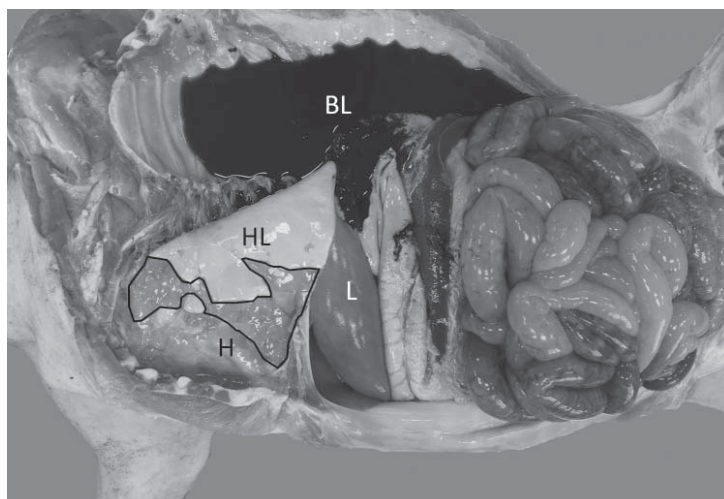
*Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyopneumoniae*) è fra le più importanti cause di PRDC ed è considerato l'agente primario della polmonite enzootica (PE), malattia respiratoria cronica del suino caratterizzata da elevata morbilità e bassa mortalità. La tosse secca, esacerbata dall'attività fisica, è il principale sintomo della PE e può persistere per settimane/mesi. Le lesioni riferibili a PE sono tipicamente bilaterali e simmetriche, di colore variabile dal rosso al grigiastro e coinvolgono le porzioni cranio-ventrali di entrambi i polmoni. Nel loro insieme, i sintomi e le lesioni sono fortemente indicative di PE, sebbene non patognomoniche (3, 4).

L'obiettivo dello studio è stato quello di valutare i pro ed i contro dell'impiego dell'ecografia toracica nel suino ai fini diagnostici, con particolare riferimento alle lesioni tipicamente osservate in corso di PE.



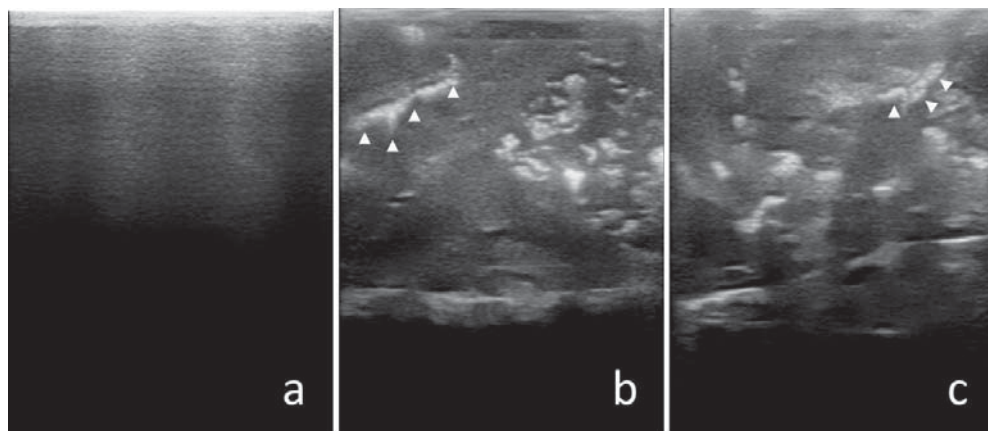
**Figura 1.** L'immagine, acquisita durante una delle necroscopie, fornisce un'idea precisa della topografia del polmone, delle coste, del cuore (H) e del fegato (L).

**Figure 1.** This picture has been taken during necropsy and details the topography of lung, ribs, heart (H) and liver (L).



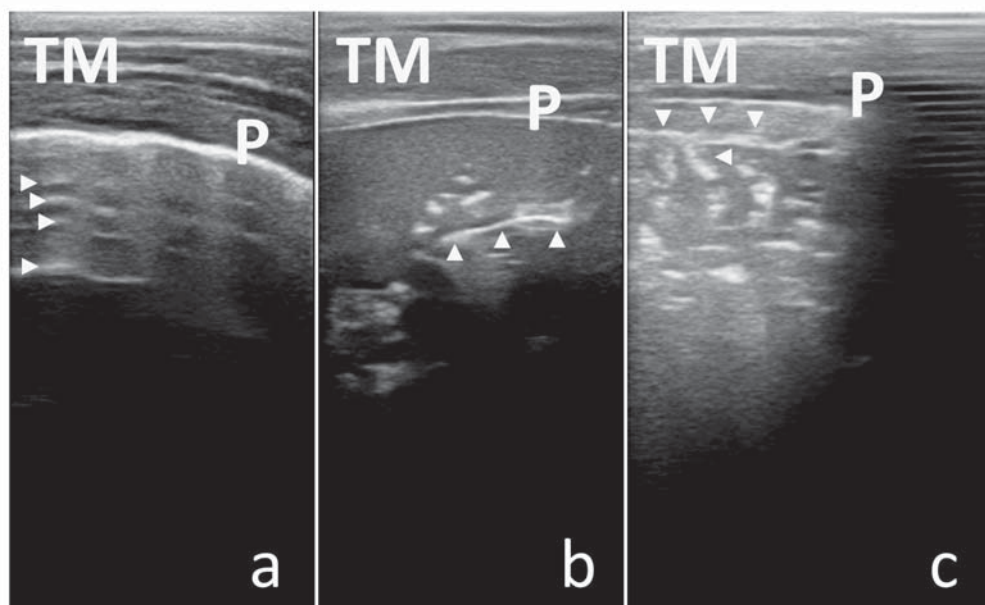
**Figura 2.** L'immagine mostra l'aspetto tipico delle lesioni riferibili a PE. Vengono indicate anche il cuore (H), il polmone sano (HL) ed il fegato (L). Il suino in questione è deceduto a seguito di un'ulcera gastrica sanguinante (BL = sangue fuoriuscito dopo l'apertura dello stomaco).

**Figure 2.** This picture shows the main features of PE-like lesions. Healthy lung parenchyma (HL), heart (H) and liver (L) are also shown. This pig died after gastric ulcer (BL = blood coming from the gastric lumen).



**Figura 3. Ecografia polmonare:**(a) artefatti da riverbero (*A-lines*) nel parenchima polmonare sano; (b, c) le aree affette da polmonite hanno un aspetto omogeneo, ipoecogeno, frammisto a strutture iperecogene piccole ed irregolari. Si osservano, inoltre, aree iperecogene lineari e ramificate (“broncogrammi”, frecce gialle).

**Figure 3. Pulmonary echography:** (a) reverberation artifacts (“A-lines”) are only seen in healthy lung. Pneumonic foci are characterized by a homogeneous, hypoechoic, “liver-like” texture and by small, irregular and scattered hyperechoic structures (b, c). Linear or branched-shaped hyperechoic areas (“bronchograms”; yellow arrows) are also observed.



**Figure 4. Ecografie toraciche su suini vivi:**(a) nei soggetti sani è possibile riconoscere la parete toracica (TM), i foglietti pleurici (P) e gli artefatti da riverbero (freccie gialle); (b, c) nei suini con malattia respiratoria in atto, si osserva una trama iperecogena costituita da aree irregolari, lineari e ramificate (freccie).

**Figure 4. Thoracic ecography of live pigs.** In healthy pig, the thoracic wall (TM), the pleural layers (P) and the so-called “A-lines” (reverberation artefacts; yellow arrows) are seen. Ultrasonograms of diseased pigs are dominated by dot, round, irregular or linear/branched-shaped hyperechoic texture (b, c; yellow arrows).

## MATERIALI E METODI

L’indagine è stata svolta in un allevamento a ciclo chiuso di medie dimensioni, che non praticava la vaccinazione nei confronti di *M. hyopneumoniae*. Nelle settimane precedenti si era verificata una grave sindrome respiratoria, causata dall’associazione *M. hyopneumoniae*/*Pasteurella multocida*.

Lo studio si è articolato in tre fasi successive, come di seguito descritto.

### **Ecografie eseguite direttamente sul polmone**

Inizialmente, 8 suini di 12-16 settimane di età, deceduti spontaneamente dopo aver manifestato una grave sindrome respiratoria, sono stati sottoposti a necropsopia. I polmoni sono stati rimossi dalla cavità toracica ed esaminati attentamente. Successivamente si è proceduto con l’indagine ecografica, eseguita applicando una sonda lineare multifrequenza (ChisonMedical Technologies Eco 3 Expert, China) direttamente sulla superficie polmonare, in corrispondenza del parenchima sano e delle aree affette da polmonite. Questa fase è stata utile per prendere familiarità con i diversi aspetti ecografici.

### **Ecografie eseguite su cadaveri e polmoni**

Sono state eseguite ecografie transcutanee sulla parete toracica destra e sinistra di 8 cadaveri (12-16 settimane di età), considerando alcune strutture anatomiche (gomito, cuore, spazi intercostali) come punti di riferimento (vedi Figura 1 per ulteriori dettagli). Successivamente,

i cadaveri sono stati sottoposti a necropsia ed i rilievi ecografici ed anatomo-patologici sono stati messi a confronto. I polmoni sono stati, quindi, rimossi dalla cavità toracica, esaminati accuratamente e sottoposti ad ecografia per apposizione diretta della sonda.

### ***Ecografia toracica su suini vivi***

Sono state eseguite ecografie toraciche su 24 suini clinicamente sani di età compresa fra 4 e 12 settimane, nonché su 8 suini di 12-16 settimane di età con sintomatologia respiratoria in atto. A tal fine, i suini sono stati contenuti in decubito laterale – destro e sinistro – senza bisogno di alcuna sedazione e tricotomia. In questo caso, l'indagine ecografica è stata eseguita anche utilizzando una sonda settoriale da 3.5 MHz, solitamente dedicata alla diagnosi di gravidanza.

## **RISULTATI**

### ***Ecografie eseguite direttamente sul polmone***

Tutti i polmoni oggetto di studio mostravano lesioni macroscopicamente riferibili a PE (Figura 2). Come atteso, l'ecografia del parenchima sano ha mostrato le cosiddette “*A-lines*”, artefatti conseguenti al riverbero degli ultrasuoni. L'ecografia dei focolai di polmonite ha evidenziato un aspetto omogeneo, simile a quello del parenchima epatico, con aree e linee iperecogene di varie forme e dimensioni (Figura 3).

### ***Ecografie eseguite su cadaveri e polmoni***

I *patterns* ecografici sopra riportati sono stati osservati anche a seguito delle ecografie effettuate sui cadaveri. I rilievi ecografici ed anatomo-patologici erano pressoché totalmente sovrapponibili.

### ***Ecografie toraciche eseguite su suini vivi***

L'ecografia toracica ha richiesto circa 5 min/suino. Non si è osservato alcun ultrasonogramma patologico nei soggetti clinicamente sani. Per contro, ultrasonogrammi compatibili con focolai di polmonite sono stati osservati in tutti i suini affetti da sindrome respiratoria (Figura 4). L'impiego della sonda settoriale da 3.5 MHz ha fornito risultati analoghi, sebbene inferiori in termini di definizione delle immagini.

## **DISCUSSIONE**

I dati raccolti indicano che l'ecografia toracica è in grado di identificare correttamente le lesioni riferibili a PE. Ciò premesso, riteniamo che i pro ed i contro di questo strumento diagnostico possano essere riassunti come segue:

- l'ecografia è una tecnica piuttosto “sicura” sia per l'operatore che per i suini;
- l'ecografia è da ritenersi economicamente vantaggiosa, poiché lo strumento è solitamente già disponibile in allevamento;
- le principali caratteristiche dell'ultrasonogramma (estensione e localizzazione delle lesioni, presenza/assenza di pleurite) possono essere di aiuto ai fini diagnostici;
- sebbene piuttosto semplice, la corretta interpretazione dei *patterns* ecografici richiede un periodo di addestramento specifico;
- l'esecuzione dell'ecografia toracica richiede tempi relativamente lunghi se eseguita su un numero cospicuo di animali;
- è ragionevole ritenere che l'ecografia toracica, nella gran parte dei casi, fornisca una diagnosi presuntiva, da integrare con ulteriori indagini di laboratorio.

## **CONCLUSIONI**

In conclusione, riteniamo che l'ecografia toracica potrebbe rappresentare un valido strumento investigativo, al fine di valutare la cinetica, la prevalenza e la gravità delle malattie respiratorie del suino. I dati forniti potrebbero integrare quelli ottenuti con altri approcci diagnostici (necropsia, *in primis*), per una gestione più precisa e razionale del PRDC.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Van Alstine W.G. (2012) “Respiratory System” in: Zimmermann J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. “Diseases of Swine”, 10a ed., Iowa: Wiley-Blackwell Publishing, 348-362.
2. Carr J., Chen S.P., Connor J.F., Kirkwood R., Segales J. (2018) “Respiratory Disorders” in: Carr J., Chen S.P., Connor J.F., Kirkwood R., Segales J. “Pig Health”, 2a ed., CRC Press, 103-152.
3. Thacker E.L., Minion F.C. “Mycoplasmosis” in: Zimmermann J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. “Diseases of Swine”, 10a ed., Iowa: Wiley-Blackwell Publishing, 779-797.
4. Maes D., Sibila M., Kuhnert P., Segales J., Haesebrouck F., Pieters M. (2018) “Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control”. *Transbound Emerg Dis.* 65 (Suppl. 1), 110–124.



# DESCRIZIONE DI UN CASO DI MORTALITA' AL RISTALLO IN UN SITO DI INGRASSO

TROGU E.

*Libero professionista, Milano*

## INTRODUZIONE

Scopo del presente lavoro è descrivere un episodio di mortalità al ristallo in un sito di ingrasso del nord Italia. Il caso si è verificato nel novembre 2019 e le prime necroscopie, effettuate in seguito alla morte di un elevato numero di suini nelle 24 ore successive al ristallo, avevano evidenziato quasi esclusivamente una lieve enterite catarrale acuta e un aumento di volume dei linfonodi inguinali e meseraici. Nella seconda visita in allevamento una più accurata indagine anamnestica ed epidemiologica ed il riscontro di sintomatologia su di un soggetto prossimo al decesso hanno invece indirizzato l'approfondimento diagnostico verso un ben preciso agente patogeno, *Encefalomiocardio virus* (EMCV), che si è infine rivelato la causa dei decessi.

*Encefalomiocardio virus* appartiene alla famiglia *Picornaviridae*, genere *Cardiovirus*; si tratta di un microrganismo diffuso in tutto il mondo, e sebbene capace di infettare oltre 30 specie di mammiferi ed uccelli, è il suino ad essere colpito con la maggior gravità. (Zimmerman et al., 2012). I roditori sono il principale *reservoir* di EMCV, nella realtà del Nord Italia è stato osservato un andamento stagionale della malattia, con picchi in autunno e inverno, quando i roditori, con il calare delle temperature ed il diminuire delle fonti di cibo disponibili nei campi, rientrano nei capannoni. I roditori disseminano il virus tramite le feci e le urine, oltre che con le carcasse infette. Sono possibili, ma decisamente meno rilevanti, anche la trasmissione orizzontale suino-suino e la verticale. La sintomatologia è estremamente variabile, da una forma fulminante con morte improvvisa a forme più o meno acute, caratterizzate da anoressia, febbre, dimagrimento, ecc... Nei riproduttori si possono osservare problematiche quali aborti, natimortalità ed aumento del numero dei mummificati. Le lesioni nei casi iperacuti possono limitarsi a emorragie epicardiche, ma solitamente si riscontrano idropericardio, idrotorace ed edema polmonare. Solitamente sono presenti aree di necrosi visibili sulla superficie miocardica come foci o striature di aspetto pallido (Zimmerman et al., 2012). Per la diagnosi ci si può avvalere delle indagini istopatologiche, isolamento virale, metodi molecolari come RT-PCR (Kassimi et al., 2002) e test sierologici (Elisa, Inibizione dell'emoagglutinazione, AGID). Non esiste ad oggi un trattamento, in caso di focolaio è necessario attuare un piano di derattizzazione ed evitare ogni stress agli animali.

In USA è in commercio un vaccino non ancora disponibile in Italia.

## DESCRIZIONE DEL CASO

L'episodio in oggetto si è registrato in un sito di ingrasso situato in Lomellina. L'allevamento è un'ex scrofaia riconvertita a sito 3, nel dettaglio la parte in passato destinata ai riproduttori alloggia ora 597 suini, mentre tre capannoni identici sono destinati ognuno a 314 suini. In altri due capannoni separati sono presenti 332 animali. Da quattro anni l'allevamento è in soccida e riceve i magroni da due siti 2 ove vengono svezzati i suinetti di un'unica scrofaia. Per i primi quattro cicli da me seguiti nel 2016/2017 vi era stata un'elevata mortalità dovuta a pleuropolmonite, confermata dall'isolamento di *Actinobacillus pleuropneumoniae*, scatenata probabilmente anche dalle scarse condizioni ambientali e strutturali. Una modifica del piano vaccinale attuato dal fornitore ha permesso di risolvere del tutto il problema, al punto che nel ciclo terminato con la macellazione dei suini a settembre 2019 si era registrata una mortalità del 2,5% circa.

Anche i suini oggetto del caso avevano ricevuto, dopo la vaccinazione per *Mycoplasma hyopneumoniae* e PCV2 in scrofaia, con la prima e la seconda vaccinazione per la malattia di Aujeszky anche il vaccino per *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Ad ottobre 2019 era stata ristallata l'area dell'ex scrofaia, mentre il 7 novembre vennero conferiti 5 camion di suini destinati ai capannoni 1, 2 e 3. Il peso medio di tali soggetti oscillava tra i 35 ed i 40 kg.

La mattina dell'8 novembre, all'arrivo in allevamento, l'allevatore riferiva che uno dei suini arrivati il giorno antecedente era deceduto mentre era ancora sul camion ed un altro durante le fasi finali dello scarico, già all'interno del box. Al momento di effettuare la visita sulla mandria il tecnico d'allevamento ha invece segnalato che altri 12 soggetti erano morti durante la notte unicamente nel capannone 1. Alla visita i suini non presentavano alcuna sintomatologia respiratoria, enterica o nervosa, mostrandosi anzi attivi ed in buon stato corporeo.

Le carcasse mostravano cianosi a livello di tronco e testa (*Figura 1*).



**Figura 1:** *Aspetto delle carcasse, cianosi a livello di tronco e testa.*

Alla necropsia, effettuata su 5 soggetti, si evidenziava all'apertura dell'addome, in assenza di versamenti, una lieve enterite catarrale acuta, accompagnata da notevole ingrossamento dei linfonodi meseraici (*Figura 2*), unita ad aumento di volume di quelli inguinali superficiali e profondi. All'apertura del torace il miocardio si presentava di consistenza e dimensioni lievemente superiori rispetto a quanto da me riscontrato usualmente su animali di quella taglia, senza lesioni visibili né all'esterno né in superficie di taglio. I polmoni presentavano in un unico soggetto un lieve edema interstiziale, in assenza di versamenti in cavità toracica. Reni, milza e fegato risultavano privi di alterazioni, la mucosa dello stomaco era normale, non si evidenziavano petecchie o lesioni alla pars esofagea.

Sono stati quindi prelevati i polmoni ed il cuore del soggetto che presentava edema polmonare, un pacchetto intestinale completo e sigillato a livello di piloro e retto, i linfonodi inguinali superficiali ed i profondi maggiormente aumentati di volume; il tutto è stato conferito con urgenza all'IZSLER (sezione di Pavia).

Il giorno successivo morirono altri tre soggetti, ed altri tre quello seguente. Il quarto giorno venne effettuata una visita ulteriore.



**Figura 2:** *Iperplasia dei linfonodi meseraici*

In questa occasione approfondii con l'operaio la dinamica delle morti: tutti i soggetti erano deceduti in una porzione di capannone dove erano stati accasati i suini del secondo camion arrivato, in nessun'altra parte del capannone 1 o dei capannoni 2 e 3 vi erano stati decessi. In un box da 12 i maiali deceduti erano stati 5, ma nessuno dei soggetti rimasti mostrava sintomi. Gli animali che venivano trovati ancora in agonia presentavano difficoltà locomotorie, affanno e cianosi a livello di tronco e testa. Alla visita clinica del solo soggetto in quel momento sintomatico ho avuto modo di apprezzare una particolare postura che avevo riscontrato in casi precedenti in animali che erano infine morti per insufficienza cardiaca. Il mio sospetto diagnostico si è quindi focalizzato su *Encefalomiocardio virus* (EMCV). Ho quindi effettuato altre tre necroscopie, riscontrando nuovamente una lieve enterite catarrale acuta con adenomegalia dei linfonodi meseraici, un lieve aumento delle dimensioni del miocardio che si presentava inoltre aumentato di consistenza rispetto agli organi che riscontro usualmente in soggetti di pari peso, e l'iperplasia dei linfonodi inguinali.

Ho quindi prelevato altri campioni: 1 pacchetto intestinale; polmoni e cuore di due suini, un rene, i linfonodi inguinali superficiali di un soggetto e gli inguinali profondi di un altro animale. Il tutto è stato conferito all'IZSLER di Lodi.

I referti evidenziarono tramite Tecnica PCR (Metodo di Prova: MP 09/051 rev. 1 – 2013) EMCV in entrambi i cuori, mentre con l'esame batteriologico effettuato con tecnica microbiologica (Metodo di Prova: MP 01/181 rev. 0 – 2012) venne isolato *Escherichia coli* dall'intestino. La PCR quantitativa per PCV2 determinò 690.000.000 copie DNA PCV/gr dal linfonodo inguinale profondo, e >999.999.999 dal linfonodo inguinale superficiale. I referti del primo Istituto interpellato, arrivati qualche giorno dopo, indicarono assenza di crescita batterica sia dai polmoni che dall'intestino e tramite Tecnica PCR Real Time (Metodo di Prova: MP 09/106 rev. 0 – 2011) 45.500.000 copie DNA PCV/gr dal linfonodo inguinale superficiale.

Nei giorni seguenti morirono altri tre soggetti, sempre dello stesso settore. Interessante notare che su 24 animali ben 20 erano di sesso maschile e solo 4 femmine. Dopo sette giorni dallo scarico la mortalità cessò del tutto.

Ad oggi (metà febbraio 2020) su tutto il capannone sono morti altri 3 suini, uno scarto e due per prolasso rettale. Tutto il resto della mandria presenta un ottimo accrescimento e non vi è stato alcun problema neppure in seguito al pareggiamento dei box con conseguente rimescolamento dei capi.

I suini ristallati tre settimane dopo negli ultimi due capannoni non presentarono alcun problema.

## DISCUSSIONE

Le problematiche da *Encefalomiocardio virus* (EMCV) sono infrequenti nei siti di ingrasso, sebbene non rare. Solitamente si riscontrano nel tardo autunno, in seguito al rientro nei capannoni dei roditori al termine della stagione mite. Nel caso in oggetto unicamente i suini di un settore hanno manifestato il problema, che però era evidentemente insorto nel sito di provenienza, in un'area circoscritta del capannone dov'erano stabulati. Dal confronto con il Collega che gestisce il sito 2 è emerso come anche in tale allevamento è frequente riscontrare mortalità da Encefalomiocardio virus all'inizio di ogni stagione autunnale, anche se generalmente i soggetti decedono nei primi periodi dopo il ristallo. In effetti non erano mai stati riscontrati problemi riconducibili a EMCV nei cicli precedenti, né nell'allevamento oggetto di questo caso né in un altro dove vengono ristallati ogni anno circa 8000 suini con la stessa provenienza.

Interessante notare come i livelli estremamente elevati di PCV2 riscontrati sui linfonodi non siano stati avvisaglia di un problema successivo. La crescita degli animali è stata eccellente e dalle dichiarazioni dei Colleghi erano stati regolarmente vaccinati per *Circovirus Suino di Tipo 2* in scrofaia come da accordi. La PCR quantitativa, che il soccidante proprietario dei suini oggetto del caso richiede sempre in caso di mortalità al ristallo, deve quindi sempre essere valutata alla luce dei rilievi clinici e di ulteriori indagini (lesioni istopatologiche e immunoistochimica).

Nessuna spiegazione è stata trovata per la differenza di mortalità tra i sessi: gli animali erano stati svezzati ed accresciuti senza separare maschi e femmine, né vi erano state differenze nei piani vaccinali.

Quello che mi ha maggiormente stupito, nella gestione del caso, è stata la mancanza delle lesioni tipiche a livello di miocardio: sia in letteratura che nella mia esperienza personale il miocardio dei soggetti deceduti a causa di EMCV mostra le classiche lesioni ben visibili ad occhio nudo, riferibili a foci di necrosi, oltre ad un aspetto flaccido. I cuori di tutti i soggetti esaminati erano perfettamente normali sulla superficie e in sezione, mostravano unicamente un aumento di consistenza ed un lieve aumento di volume. Come conferma dei risultati ottenuti dalla PCR sarebbe stato necessario procedere con un esame istologico. Questo non è stato effettuato per una questione di costi in prima battuta, e secondariamente per il rapido esaurirsi di sintomatologia e mortalità. Probabilmente se non avessi avuto modo di osservare l'unico soggetto sintomatico non avrei richiesto la PCR per *Encefalomiocardio virus*, e a fronte dei risultati dello stesso esame per PCV2 forse avrei ritenuto erroneamente implicato nei decessi anche quel patogeno, che invece, come da dati produttivi, non ha in seguito causato alcun problema alla mandria.

## BIBLIOGRAFIA

1. Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Scharltz K.J., Stevenson W. "Diseases of swine", 10a ed., UK, Wiley-Blackwell, 606-610.
2. Kassimi LB, Gonzague M, Boutrouille A, Cruciere C. "Detection of encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and one-step RT-PCR." J Virol Methods. 2002 Mar;101(1-2):197-206.

# INCREMENTO DEL PESO ALLO SVEZZAMENTO IN SUINETTI ALIMENTATI CON LATTE ARTIFICIALE A SUPPORTO DEL LATTE MATERNO DURANTE LA LATTAZIONE

## INCREASED WEIGHT AT WEANING IN PIGLETS FED WITH ARTIFICIAL MILK TO SUPPORT BREAST MILK DURING LACTATION

VELOCI M.<sup>3</sup>, ROMANO G.<sup>1,3</sup>, RICCI A.<sup>2</sup>, SCOLLO A.<sup>1,3</sup>, MAZZONI C.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Swivet Research, Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, 10095 Grugliasco Torino

<sup>3</sup>Crinvet snc Via Ernesto Che Guevara 55, 42123 Reggio Emilia

**Parole chiave:** latte supplementare, peso allo svezzamento, incremento medio giornaliero  
**Key words:** supplementary milk, weaning weight, average daily gain

### RIASSUNTO

Uno dei maggiori obiettivi che si pone l'allevatore dei siti uno è quello di ottenere il miglior ritorno economico possibile dalle vendite dei suinetti, per fare questo deve produrne di numero e di peso elevati. A tale scopo, l'industria suinicola ha ideato vari metodi per aiutare i suinetti nella loro crescita in lattazione, tra cui la somministrazione di latte supplementare artificiale in aggiunta al latte materno. Lo scopo di questo studio è stato di mettere a confronto un gruppo controllo (scrofe n=1.181; suinetti svezzati n=12.356), alimentato solo con latte materno, e un gruppo trattato (scrofe n=2.573; suinetti svezzati n=15.300), a cui è stato aggiunto anche un supplemento di latte artificiale erogato in appositi cups, in merito al peso allo svezzamento, all'incremento medio giornaliero, alla mortalità pre-svezzamento e al consumo di mangime secco sotto scrofa. Mentre gli ultimi due parametri non hanno manifestato alcuna differenza significativa tra i due gruppi ( $P>0,05$ ), i primi due si sono dimostrati significativamente più alti ( $P<0,001$ ) nel gruppo trattato, che dunque ha svezzato lo stesso numero di suinetti del gruppo controllo ma di un peso superiore. Ciò si è tradotto in un maggior ritorno economico per l'allevatore, che a fronte di un investimento iniziale ha ottenuto un guadagno superiore. Sarebbero interessanti ulteriori studi su come la stagionalità possa influenzare il consumo di latte supplementare o su come l'alimentazione esclusiva con questo sostituto del latte materno possa condurre a comportamenti anomali nei suinetti.

### ABSTRACT

One of the major objectives of the modern pig farmer is to obtain a good economic return with the sales of weaning piglets and, in order to do so, he must sell a good number and a good weight. For this reason, the pig industry has devised various methods to assist piglets in their growth in lactation, including the administration of supplemental milk in addition to breast milk. The purpose of this study was to compare a control group (sows n=1.181; weaned piglets n=12.356), fed only with breast milk, and a treated group (sows n=2.573; weaned piglets n=15.300), to which has also been added a supplement milk dispensed in special cups, with regard to weaning weight, average daily increase, pre-weaning mortality and consumption of dry feed under sow. While the last two parameters showed no significant difference between the two groups ( $P>0,05$ ), the first two proved significantly higher ( $P<0,001$ ) in the treated group, which therefore weaned the same number of pigs of the control group but of a higher weight. This has resulted in a higher economic return for the farmer,



who finally obtained a higher gain compared to an initial investment. Further studies on how seasonality can influence the consumption of additional milk or how the exclusive feeding with this milk substitute can lead to abnormal behavior in piglets would be interesting.

## INTRODUZIONE

Nell'ambito dell'allevamento intensivo suinicolo il periodo che intercorre tra la nascita e lo svezzamento, rappresenta una fase molto critica per il suinetto (Novotni-Danko et al., 2015). In questo periodo, infatti, è fondamentale che il suinetto riceva una corretta alimentazione, poiché il giusto apporto energetico e nutritivo consente la produzione di regolatori paracrini ed endocrini, adibiti alla modulazione del corretto sviluppo intestinale (Trahair e Sangild, 1997; Lallès et al., 2007; Guilloteau et al., 2010; Jacobi e Odle, 2012; Stupecka et al., 2012). Se l'alimentazione fornita risulterà adeguata, il suinetto sarà in grado di raggiungere un buon peso allo svezzamento, che si ripercuoterà positivamente anche nelle successive fasi di magronaggio-ingrasso. Raggiungere un buon peso allo svezzamento è diventato ormai un obiettivo fondamentale, soprattutto oggi dove elevata è la propensione degli allevatori a svezzare suinetti sempre più precocemente (Novotni-Dankó et al., 2015). Inoltre, anche svezzare un numero elevato di suinetti è diventato di fondamentale importanza, poiché un maggior numero di suinetti venduti si traduce inevitabilmente in un più alto ritorno economico, a maggior ragione se il peso dei suinetti è elevato.

Da qualche anno a questa parte, infatti, sono state sempre più selezionate linee genetiche iperprolifiche, che hanno consentito di dare alla luce un gran numero di suinetti, passando da 11 a 16 suinetti nati vivi per scrofa (Sandøe et al., 2012). Questo notevole aumento delle dimensioni della nidata ha condotto indirettamente ad una maggiore variabilità di peso all'interno della stessa e ad un aumento della percentuale di soggetti nati con basso peso (<1.0 kg). È importante sottolineare che, con un peso alla nascita inferiore a 1 kg, più dell'11% dei suinetti nasce morto e più del 17% non sopravvive alle prime 24 ore di vita; in questi casi diventa quindi determinante il tempestivo intervento degli operatori aziendali. Il loro obiettivo principale diventa aumentare la sopravvivenza dei suinetti sottopeso e incrementare nel più breve tempo possibile il loro peso (Novotni-Dankó et al., 2015). Tuttavia, il principale fattore che limita la crescita dei suinetti prima dello svezzamento è la quantità di latte che ingeriscono durante la lattazione e, nonostante la produzione di latte da parte della scrofa aumenti in seguito ad una maggiore richiesta da parte dei suinetti (Algers e Jensen, 1985), ogni scrofa possiede un massimo individuale di produzione. È proprio a causa di questa variabilità nella quantità di latte prodotto dalla scrofa che, al momento dello svezzamento, il peso dei suinetti può variare, anche considerevolmente, tra una covata e l'altra. Il problema principale risiede nel fatto che, negli ultimi decenni, la capacità massima di produzione individuale di ciascuna scrofa non è cresciuta in maniera proporzionale al numero di suinetti nati vivi e, di conseguenza, la quantità effettiva di latte assunta per suinetto è diminuita (King, 2000). Una minor assunzione di latte e colostro determina però effetti negativi sui suinetti, come un aumento della mortalità in lattazione (Vasdal et al., 2011) e una diminuzione dell'incremento medio giornaliero pre-svezzamento (Auldist et al., 1998). Per far fronte a questa situazione, gli allevatori hanno sviluppato diverse strategie, tra cui l'utilizzo di scrofe da balia o l'impiego di sistemi di allattamento artificiali, i quali forniscono latte supplementare a quello materno, solitamente erogandolo all'interno di piccoli contenitori chiamati cups. Secondo Ha et al. (2011), fornire la giusta formulazione di latte supplementare può aumentare l'apporto di nutrienti ai suinetti, con conseguente aumento del loro peso. Inoltre, diversi autori (Wolter et al., 2002; Park et al., 2014) sostengono nei loro studi che fornire come supplemento alimentare un sostituto del latte liquido nel periodo sotto scrofa aumenta il peso allo svezzamento dei suinetti che ne fanno uso.

Lo scopo di questo studio è stato valutare se la somministrazione aggiuntiva di latte supplementare a quello materno ha portato dei benefici ai suinetti in termini di peso allo svezzamento, incremento medio giornaliero, mortalità pre-svezzamento e consumo di mangime secco sotto scrofa.

## MATERIALI E METODI

Questo studio è stato condotto in un allevamento intensivo sito nella provincia di Pavia (Italia), che alloggia circa 3.500 scrofe di genetica Topigs, per un totale di 7.300 parti all'anno. 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. L'allevamento è costituito dal solo sito 1 e svezza suinetti di circa 27-30 giorni di età, i quali vengono trasferiti in diversi siti 2 presenti in provincia di Brescia e Bergamo. Le code vengono mantenute integre e la castrazione viene effettuata con l'utilizzo di anestesia e analgesia. Le scrofe in lattazione ricevono un'alimentazione di tipo liquido, tranne nel giorno del parto in cui vengono alimentate a secco. Nelle sale parto la temperatura viene mantenuta attorno ai 23°C ed è presente un sistema di ventilazione a pressione negativa, oltre che un sistema di raffrescamento, tipo cooler, attivo dalla fine di maggio fino alla fine di settembre. Le sale parto sono costituite sia da gabbie parto di tipo convenzionale, quindi chiuse, sia da gabbie parto di tipo apribile, quest'ultime costruite al fine di garantire un maggiore benessere alle scrofe in lattazione. Da un punto di vista sanitario, il sito uno in oggetto è classificato di tipo convenzionale quindi positivo per *PRRSv* e *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Lo studio è stato condotto tra fine dicembre 2018 e fine dicembre 2019 e ha visto coinvolti un totale di 3.754 scrofe, sia pluripare che primipare, e 27.656 suinetti svezzati. Sono stati formati due gruppi di studio: un gruppo controllo (scrofe n=1.181; suinetti svezzati n=12.356), in cui i suinetti avevano a disposizione solo il latte materno, e un gruppo trattamento (scrofe n=2.573; suinetti svezzati n=15.300), in cui ai suinetti è stato messo a disposizione del latte supplementare oltre al latte materno. Le gabbie utilizzate per la prova sono state indifferentemente quelle convenzionali e quelle aperte, ciascuna delle quali era fornita di un cups, all'interno del quale poteva essere erogato il latte supplementare a freddo, dopo essere stato ricostituito alla diluizione di 20 kg di latte in polvere in 150 litri di acqua all'interno di un apposito impianto. I cups sono stati aperti a partire dal 2° giorno di vita solo nelle gabbie appartenenti al gruppo trattato, mentre entrambi i gruppi hanno ricevuto un mangime a secco a partire dal 7° giorno di età, come di consuetudine per l'allevamento ospitante.

Per ciascuna scrofa è stato annotato il numero di nati vivi, il numero di svezzati e la mortalità avvenuta nel corso dell'intera lattazione, raggruppando in essa tutte le possibili cause di morte (es.: schiacciamento, sottopeso, scarto, diarrea, meningite). Ogni covata per gruppo è stata pesata individualmente alla nascita, mentre allo svezzamento sono state pesate più covate insieme in corrispondenza del carico per il trasferimento al sito 2, mantenendo comunque separati il gruppo controllo dal gruppo trattato. In un secondo momento è stato calcolato anche l'incremento medio giornaliero e il consumo di mangime secco sotto scrofa per suinetto. Nella tabella 1 sono riportati i dati principali riguardanti la prova.

|                         | N° scrofe | Nati vivi/scrofa | Svezzati/scrofa |
|-------------------------|-----------|------------------|-----------------|
| <b>Gruppo controllo</b> | 1.181     | 12               | 11              |
| <b>Gruppo trattato</b>  | 2.573     | 11,9             | 10,8            |

**Tabella 1.** Numero di scrofe, nati vivi per scrofa e svezzati per scrofa coinvolti nello studio.

**Table 1.** Number of sows, born alive per sow and weaned per sow involved in the study.

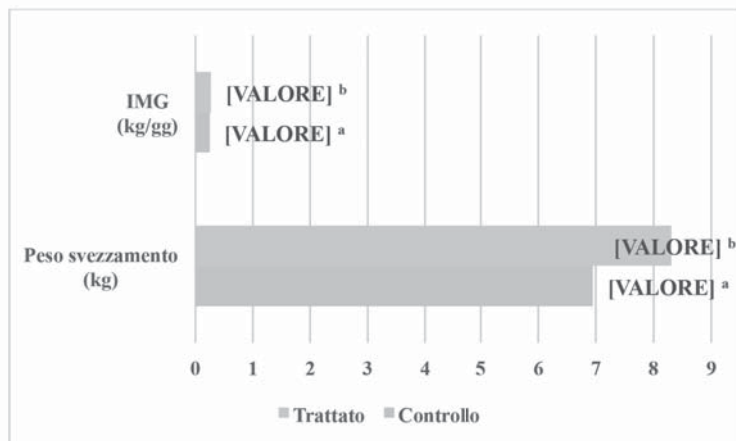
*Analisi statistica*



I dati sono stati analizzati utilizzando il Kruskal-Wallis test, che rappresenta un metodo non parametrico per verificare l'uguaglianza delle mediane di diversi gruppi. Per l'analisi statistica sono stati presi in considerazione i dati relativi al peso medio alla nascita, al peso medio allo svezzamento, all'incremento medio giornaliero, alla mortalità e al consumo di mangime sotto scrofa per suinetto. La significatività (P) è stata posta a 0,05.

## RISULTATI

Dall'analisi statistica effettuata, il peso medio alla nascita dei due gruppi non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa (1,28 kg vs 1,32 kg, rispettivamente per gruppo controllo e trattato;  $P=0,7$ ), il che garantisce l'omogeneità di partenza dei due gruppi di studio. Non è stata rilevata alcuna differenza significativa neanche per quanto riguarda la mortalità pre-svezzamento (10% vs 9%, rispettivamente per gruppo controllo e trattato;  $P=0,33$ ) e il consumo di mangime secco sotto scrofa per suinetto (0,24 kg vs 0,21 kg, rispettivamente per gruppo controllo e trattato;  $P=0,1$ ). Per quanto riguarda invece il peso medio allo svezzamento e l'incremento medio giornaliero, l'analisi statistica ha evidenziato per entrambi una differenza fortemente significativa ( $P<0,001$ ) a favore del gruppo trattato, come illustrato più nello specifico nel grafico 1.



**Grafico 1.** Incremento medio giornaliero (IMG) e peso medio allo svezzamento nei due gruppi di studio. a, b:  $P\leq 0,05$ .

**Graphic 1.** Average daily gain (IMG) and average weaning weight in the two study groups. a, b:  $P\leq 0,05$ .

## DISCUSSIONE

Un allevatore in grado di raggiungere un elevato standard di efficienza produttiva all'interno del proprio allevamento deve parte del suo successo alla buona gestione della sala parto, dove il latte assunto dai suinetti gioca un ruolo significativo. La quantità, come altresì la qualità di latte fornito ai suinetti influenza la salute di quest'ultimi, oltre a determinarne il potenziale di crescita nelle successive fasi di svezzamento, magronaggio e ingrasso (Khonmee et al., 2018). Il latte, infatti, rappresenta la primaria fonte di energia per il suinetto, fondamentale per la sua crescita e sopravvivenza. La quantità di latte fornita ai suinetti dipende chiaramente dalla capacità lattifera propria di ogni singola scrofa, ma viene anche influenzata dal numero di animali allattati, dalla loro dimensione, dal loro vigore di suzione e dal periodo di lattazione. Uno dei problemi che devono affrontare gli allevatori in questi ultimi anni

è il fatto che le scrofe non riescono a produrre una quantità di latte sufficiente a coprire il fabbisogno ottimale della propria prole. Questa inefficienza si riscontra approssimativamente a partire dall'8°-10° giorno di età e la situazione continua a peggiorare con il progredire della lattazione; inoltre questa problematica è stata esacerbata con la recente introduzione delle linee genetiche iperprolifiche (Kyriazakis et al., 2006; Farmer, 2013). Attualmente, una scrofa produce circa 8-10 kg di latte al giorno, mentre un suinetto ne ingerisce fino 1-1,3 kg al giorno (Kirchgeßne et al., 2008), quindi la quantità di latte fornita dalla madre non sarà sufficiente a fornire un adeguato nutrimento a tutti i componenti della nidiata (Baumann et al., 2012). Inoltre, se il numero di capezzoli funzionanti è minore rispetto al numero dei suinetti, non sarà sufficiente per assicurare una giusta fonte di alimentazione a tutta la nidiata e i suinetti rischieranno di morire di inedia, o comunque un variabile ritardo nella crescita, a causa della competizione con i fratelli e dell'inadeguato allattamento (Andersen et al., 2011). Per ovviare a queste problematiche e riuscire ad allattare un eventuale eccedenza di suinetti, gli allevatori potrebbero adottare diverse strategie, quali il cross-fostering o allattamento parziale (Kirkden et al., 2014; Edwards e Baxter, 2015), l'utilizzo di balie (Pustal et al., 2015) o la somministrazione di latte supplementare (Knoop, 2009; Miller et al., 2012; Baxter et al., 2013).

Il presente studio ha voluto approfondire quest'ultima strategia e si è posto l'obiettivo di confrontare covate alimentate soltanto con il latte materno e covate alimentate con anche l'aggiunta di un supplemento di latte artificiale, analizzando, per ciascuno dei due gruppi, il peso allo svezzamento, l'incremento medio giornaliero, la mortalità pre-svezzamento e il consumo di mangime secco sotto scrofa. I risultati ottenuti confermano quanto già evidenziato da Azain et al. (1996) e Miller et al. (2012), i quali dimostrarono che questo tipo di supplemento al latte materno porta ad un aumento significativo del peso allo svezzamento, oltre che ad un aumento del peso complessivo della covata. Questo effetto positivo sul peso allo svezzamento deriva probabilmente da una aumentata disponibilità di nutrienti forniti dal latte artificiale, che, essendo ad alto contenuto nutritivo, fornisce un supplemento di nutrienti di fondamentale importanza, soprattutto nella parte finale della lattazione quando la produzione di latte materno non riesce a soddisfare adeguatamente i fabbisogni di crescita della covata (Azain et al., 1996). L'analisi dei dati riguardanti l'incremento medio giornaliero ha evidenziato anch'essa una forte differenza statisticamente significativa a favore nel gruppo trattato, sebbene ciò sembrerebbe differire con quanto affermato da Pustal et al. (2015). Questa discrepanza bibliografica risiede probabilmente nel fatto che all'interno dello studio di Pustal et al. (2015) il numero di suinetti presenti nei due gruppi sperimentali non era equivalente, bensì il gruppo con il supplemento di latte aveva un suinetto in più per covata rispetto al gruppo controllo. Ciò si traduce in un aumento delle dimensioni della covata, con conseguente diminuzione dell'incremento medio giornaliero del singolo suinetto, che però non si ripercuote sul peso medio allo svezzamento grazie alla compensazione fornita dal supplemento di latte artificiale (Auldist et al. 2000).

Per quanto riguarda la mortalità pre-svezzamento, Dewey et al. (1995) hanno riportato nel loro studio un aumento dei casi di mortalità per diarrea in seguito all'uso di latte supplementare, la cui causa principale sembrerebbe risiedere nella conseguente riduzione di assunzione del latte materno, ma nel presente studio non è stato riscontrato questo tipo di problematica. I risultati ottenuti hanno infatti evidenziato che la mortalità in lattazione non ha differito nel gruppo trattato rispetto al gruppo controllo, il che ha conseguentemente portato ad un numero di suinetti svezzati omogeneo tra i due gruppi (vedi tabella 1), con in più il vantaggio del peso maggiore nel gruppo trattato.

Neanche il consumo di mangime secco sotto scrofa per suinetto ha evidenziato differenze significative tra i due gruppi, contrariamente a quanto registrato da Pustal et al. (2015), il

quale ha invece evidenziato un aumento di ingestione di mangime secco nei suinetti del gruppo alimentato con un supplemento di latte artificiale. Quest'ultimo studio si trova in forte disaccordo con quanto osservato da Baumann (2011), secondo cui i suinetti alimentati con il supplemento di latte artificiale riportano un minor consumo di mangime secco rispetto al gruppo controllo. Poiché un buon consumo di mangime secco nel periodo sotto scrofa predispone il suinetto ad una buona crescita anche nel successivo periodo (Weber et al., 2011), sarebbe interessante effettuare ulteriori studi per valutare nello specifico la relazione tra il consumo di mangime secco sotto scrofa in suinetti alimentati con supplemento di latte artificiale e l'effetto che questo determina sulla futura capacità di crescita degli animali.

Diversi autori (Azain et al., 1996; Miller et al., 2012; Novotni-Dankó et al., 2015), inoltre, hanno evidenziato differenze significative relative al peso individuale dei suinetti allo svezzamento, confrontando nidiata cresciute con supplemento di latte e nidiata cresciute senza. 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, rappresentando una perdita economica per l'allevatore. Studi precedenti (King et al., 1997; Wolter et al., 2002; Gondret et al., 2005; Vaclavkova et al., 2012) hanno infatti 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. In ogni caso è stato valutato l'impatto economico di questa attività sulla redditività aziendale partendo dal costo di ammortamento dell'impianto: 65,00€/gabbia parto ammortizzata in 7 anni, pertanto 9,29€/gabbia parto/anno (65€/7anni). Quindi tenuto conto del numero degli svezzati/scrofa/anno che, nella fattispecie sono stati 25,5, porta ad un costo/ammortamento/suinetto per anno di 0,36€ (9,29/25,5). Il costo del latte in polvere si è attestato attorno ai 285,00€/qle e tenuto conto che, il consumo per suinetto misurato in azienda è stato di 1,550 kg/capo/ciclo, il costo finale del latte è stato di 4,41€/suinetto/ciclo. Il totale delle spese è stato di 4,77€/suinetto svezzato derivante dalla somma del costo di ammortamento/suinetto della struttura e dal costo del latte consumato/suinetto (0,36€+4,41€). Il calcolo del ricavo economico è stato realizzato applicando la scala mobile dedicata, sviluppata nel seguente modo: ricavato il prezzo al kg dei 7 kg in base al CUN (Commissioni Uniche Nazionali) 2019 (49,75€/7kg) pari a 7,10€ ed il prezzo al kg dei 15 kg in base al CUN 2019 (64,14€/15kg) pari a 4,28€, è stato ricavato il valore della differenza fra i due, pari a 2,82€ (7,10€-4,28€). Abbiamo poi diviso il differenziale ottenuto per i kg di differenza fra i due pesi (15kg-7kg=8kg) pari a 0,35€ (2,82€/8kg). Questo valore è stato poi moltiplicato per i kg ottenuti a seguito della somministrazione del latte 0,35€x1,36kg (8,31kg-6,95kg)=0,46€. Sottraendo questo valore al prezzo del kg unitario dei 7 kg (7,10€-0,46€) otteniamo un dato di 6,64€ che moltiplicato per i kg ottenuto, 1,36 kg, ci permette di ottenere il ricavo relativo ai kg in più realizzati pari a 9,03€ (1,36kgx6,64€) ed un guadagno effettivo finale di 4,26€ (9,03€-4,77€). Con un conseguente ritorno sull'investimento di: 0,89:1 (ROI=Utile derivato/Capitale investito= (9,03€-4,77€)/4,77€=0,89<sup>2</sup> quindi per ogni euro investito abbiamo un ritorno di 0,89€). Tale ritorno economico rappresenta un ottimo risultato a livello aziendale che potrà migliorare ulteriormente se il sistema contribuirà ad incrementare gli svezzati/scrofa/anno come nella fattispecie è possibile attendersi.

In questo studio, purtroppo, non è stato possibile analizzare altri aspetti molto interessanti, come l'effetto della stagionalità sul maggiore o minore consumo di latte artificiale o i risvolti comportamentali sui suinetti alimentati esclusivamente con un supplemento di latte, e meriterebbero di essere approfonditi in futuri studi. Diversi autori (Azain et al., 1996; Renaudeau e Noblet, 2001; Baumann, 2011; Knecht et al., 2015) hanno infatti riportato che i suinetti aumentano la loro assunzione di latte supplementare durante la stagione calda,

quando le scrofe diminuiscono la produzione di latte, al fine di rimediare alla perdita di peso che avrebbero in assenza di un supplemento artificiale. Facendo invece riferimento ad un altro contesto, alcune fonti<sup>1</sup> affermano che per un suinetto il fatto di crescere senza la presenza della madre, quindi con il solo allattamento artificiale, possa creare dei problemi di tipo comportamentale, quali il “*belly nosing*”, ovvero l’azione di stimolare e massaggiare ripetutamente con il grugno soprattutto l’addome dei conspecifici allevati nello stesso box, poiché corrisponde proprio al movimento che i suinetti compiono naturalmente durante la suzione dalle mammelle della madre. Sarebbe quindi molto interessante studiare più nello specifico anche questi due aspetti legati all’assunzione di latte supplementare, seppur non strettamente correlati tra loro.

## CONCLUSIONI

Questo studio ci ha permesso di evincere come l’utilizzo di un supplemento di latte artificiale nella dieta di suinetti sotto scrofa possa rappresentare un valido strumento in grado di aiutare la scrofa ad alimentare al meglio la propria prole, garantendogli nel contempo una maggiore disponibilità di nutrienti. Tutto ciò favorisce una crescita migliore e più uniforme della nidiata, nonché lo svezzamento di un buon numero di suinetti e di peso maggiore, il che si traduce in un migliore ritorno economico per l’allevatore, a fronte comunque di un investimento iniziale. Meriterebbero maggiori approfondimenti alcuni aspetti legati all’utilizzo del supplemento di latte artificiale in sala parto, come la variazione stagionale del suo consumo o i risvolti comportamentali correlati alla sua esclusiva presenza come unica fonte di alimentazione in sostituzione della madre.

## RINGRAZIAMENTI

Un ringraziamento particolare alla Società Agricola La Panizzina, con particolare riguardo alle figure di Mauro Ferrari e Massimiliano Angluzzi, per aver permesso lo svolgimento della prova ed aver condiviso i dati in loro possesso.

## 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. Andersen I. L., Nævdal E., Bøe K. E. (2011) “Maternal investment, sibling competition, and offspring survival with increasing litter size and parity in pigs (*Sus scrofa*)”. *Behav Ecol Sociobiol* 65: 1159–1167.
3. Auldist D., Carlson D., Morrish L., Wakeford C., King R. (2000) “The influence of suckling interval on milk production of sows”. *J Animal Sci.* 78: 2026–2031.
4. Auldist D., Morrish L., Eason P., King R. (1998) “The influence of litter size on milk production of sows”. *Animal Sci.* 67: 333–337.
5. 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.
6. Baumann S. (2011) “Automatische Milchbeifütterung von Saugferkeln Teil 1: Gesundheits- und Leistungsmerkmale der Sauen und Ferkel”. Landesanstalt für Schweinezucht Boxberg: Report, p. 1–3.
7. 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.

---

<sup>1</sup> <https://usav-rapportoricerca.ch/ferkelzucht/>

<sup>2</sup> <https://www.likecasa.it/calcolo-roi/5736>

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Farmer C. (2013) "Review: Mammary development in swine: effects of hormonal status, nutrition and management, *Can. J. Anim. Sci.* 93: 1–7.
12. Friedlob G. T., Plewa F. J. (1996) "Understanding return on investment", John Wiley and Sons, ISBN 0-471-10381-0.
13. 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.
14. Guilloteau P., Zabielski R., Hammon H. M., Metges C. C. (2010) "Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man?" *Nutr. Res. Rev.* 23(01):4–22.
15. 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.
16. Jacobi S. K., Odle J. (2012) "Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate". *Adv. Nutr.* 3: 687–696.
17. Khonmee J., Wathirunwong T., Yano T., Somgird C., Brown J. L., and Yamsakul P. (2018) "Effect of Artificial Piglet Suckling Sounds on Behavior and Performance of Piglets and Adrenal Responses of Sows", *Veterinary Medicine International*, Article ID 2762153.
18. King R. H. (2000) "Factors that influence milk production in well-fed sows". *J Animal Sci.* 78:19–25.
19. 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.
20. Kirchgeßner M., Roth R. X., Schwarz F. J., Stangl G. I. (2008) "Tierernährung. Frankfurt am Main", DLG Verlag GmbH, 12. Aufl.
21. Kirkden R. D., Broom D. M., Andersen I. L. (2014) "INVITED REVIEW: Piglet mortality: Management solutions". *J Anim Sci.* 91:3361–89.
22. Knecht D., Srodon S., Duziowski K. (2015) "The impact of season, parity and breed on selected reproductive performance parameters of sows". *Arch. Anim. Breed.* 58, 49–56.
23. Knoop S. (2009) "Einsatz von Ferkelammern". Bildungs- und Wissenszentrum Boxberg, Newsletter, Juni 2009.
24. Kyriazakis, I., Whittemore, C. T., and Whittemore, C. T.: *Whittemore's science and practice of pig production*, 3rd edn.,
25. Lallès J.-P., Bosi P., Smidt H., Stokes C. R. (2007) "Nutritional management of gut health in pigs around weaning". *Proc. Nutr. Soc.* 66(02): 260–268.
26. 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.

27. 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.
28. Park B. C., Ha D. M., Park M. J., Lee C. Y. (2014). "Effects of milk replacer and starter diet provided as creep feed for suckling pigs on pre- and post-weaning growth". *Anim. Sci. J.* 85(9): 872–878.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Ślupecka M., Woliński J., Pierzynowski S. G. (2012) "The effects of enteral ghrelin administration on the remodeling of the small intestinal mucosa in neonatal piglets". *Regul. Pept.* 174(1–3):38–45.
33. Trahair J. F., Sangild P. T. (1997) "Systemic and luminal influences on the perinatal development of the gut. *Equine Vet. J. Suppl.* 24(Suppl.):40–50.
34. Vaclavkova E., Danek P., Rozkot M. (2012) "The influence of piglet birth weight on growth performance". *Res. Pig Breed.* 6, 59–61.
35. 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.
36. Weber M., Strack K. E. (2011) "Schweineproduktion". In: Weiß JW, Granz S, Pabst W, editors. *Tierproduktion*. Stuttgart, Germany: Enke Verlag, p. 403–80.
37. 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.





# MONITORAGGIO DI PLEURITI, POLMONITI E LESIONI ALLA CODA IN SEDE DI MACELLAZIONE E INTERAZIONI CON PARAMETRI PRE-MACELLAZIONE E DI QUALITÀ DELLA CARCASSA

## ***SURVEY OF PLEURISY, PULMONARY LESIONS AND TAIL LESIONS IN PIGS AT ABATTOIR AND INTERACTION WITH PRE-SLAUGHTER CONDITIONS AND CARCASS QUALITY***

VITALI M<sup>1</sup>., LUPPI A.<sup>2</sup>, SPINELLI E<sup>1</sup>, BONILAURI P.<sup>2</sup>, SANTACROCE E.<sup>1</sup>, TREVISI P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – DISTAL, Università di Bologna.*

<sup>2</sup>*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna -IZSLER*

**Parole chiave:** macello, polmoniti, lesioni coda.

**Key words:** abattoir, pulmonary lesions, tail lesions.

### RIASSUNTO

Le lesioni alla coda nei suini rappresentano una problematica sia di benessere animale che di tipo economico e, assieme ai disturbi respiratori, costituiscono una delle maggiori criticità sanitarie nel settore suinicolo. L'obiettivo di questo studio è stato di analizzare la prevalenza e la gravità di pleuriti, polmoniti e lesioni alla coda attraverso l'attività ispettiva svolta in un macello italiano. Un'ulteriore analisi è stata condotta al fine di investigare eventuali relazioni esistenti tra queste lesioni e i parametri pre-macellazione (distanza dal macello, attesa pre-macellazione e stagione di macellazione) e di qualità della carcassa (peso della carcassa e percentuale di carne magra). Durante un periodo di 12 mesi, 79 partite provenienti da 43 allevamenti diversi tra i fornitori dello stesso macello sono state valutate per lesioni anatomopatologiche, lesioni alla coda, parametri relativi al trasporto e alla pre-macellazione, qualità della carcassa. Tutte le partite riguardavano suini destinati al circuito DOP del Prosciutto di Parma e San Daniele. Le lesioni broncopolmonari sono state punteggiate secondo il metodo *Madec and Derrien*, le pleuriti sono state punteggiate impiegando la griglia SPES (*Slaughterhouse pleuritis evaluation system*). I suini oggetto del monitoraggio hanno evidenziato una prevalenza di lesioni broncopolmonari del 30.2 %, un dato in forte riduzione se comparato ai risultati degli studi precedenti. Viceversa, si mantiene costante il dato relativo al rilievo delle lesioni dorso-caudali della pleura, confermando l'importante incidenza delle pleuriti nella realtà produttiva. Il dato emerso in questo studio sulla prevalenza delle lesioni alla coda, considerando le lesioni lievi (29.64%) e gravi (4.44%) appare in linea con i dati raccolti negli ultimi anni. Lo studio dell'interazione tra i fattori ha evidenziato un'associazione tra la maggiore presenza di pleuriti e polmoniti e diminuzione del peso a freddo della carcassa. Un ridotto tenore percentuale in carne magra è stato associato a condizioni di stress premacellazione imputabili sia al trasporto che alla presenza di lesioni alla coda e polmonari.

### ABSTRACT

Tail lesion are one of the major challenges in pig welfare worldwide. It has also financial implications, as well as respiratory diseases, and both of them represent one of the main health problems in the pork chain. The aim of the study was to measure the prevalence and severity of pleurisy, pneumonia and tail lesions in an Italian abattoir. Therefore an investigation among the relationship between these parameters and pre-slaughter conditions (transport distance and lairage duration) and carcass quality was assessed. During a 12 months-period

79 batch (43 farms) were assessed for: anatomo-pathological lesions, tail lesions, pre-slaughter conditions and carcass quality. Pulmonary lesions were scored using the Madec and Derrien scale. Pleurisy were scored using SPES grid. Prevalence of pulmonary lesions were 30.2%, showing a reduction of prevalence compared to previous studies. On the contrary, prevalence of dorso-caudal lesions of the pleura remained constant, confirming the distribution of pleurisy in pig production. Tail lesions prevalence evidenced that 29.64% of pigs showed middle lesions, while the 4.44% had severe injuries, according to European data on tail lesion collected at slaughter. Interactions showed a negative association of pneumonia and pleurisy with carcass weight. A reduce lean meat percentage was found related to pre-slaughter stress, attributable to both transport, and the prevalence of tail and pulmonary lesions.

## INTRODUZIONE

L'attività ispettiva svolta al macello ha il ruolo principale di garantire la sicurezza alimentare (van Staaveren *et al.*, 2016) 95% CI 1.51-2.34. Essa offre inoltre la possibilità di raccogliere grandi quantitativi di dati sulla linea di macellazione, con un enorme potenziale per la sorveglianza e il monitoraggio di parametri di salute e benessere animale (EFSA, 2011). Per questo motivo, vi è un crescente interesse, da parte delle istituzioni e dell'industria, nella raccolta di indicatori di benessere animale, che ha portato in alcuni casi alla nascita di sistemi di monitoraggio nazionali presso alcuni Stati dell'Unione Europea (Teixeira *et al.*, 2016).

Una delle maggiori problematiche sanitarie nel settore suinicolo è rappresentata dai disturbi respiratori, in quanto possono causare ingenti perdite economiche (Merialdi *et al.*, 2012) ranging in age from 9 to 10. months, from 48 batches of pigs belonging to an equal number of herds, were included in the study. Bronchopneumonic lesions suggestive of enzootic pneumonia (EP-like lesions). Le lesioni broncopolmonari si possono verificare a causa dell'interazione tra agenti eziologici, condizioni di allevamento (ambientali e di management) e condizioni dell'ospite (Merialdi *et al.* 2012). Esse possono causare significative perdite produttive, in particolare una riduzione delle performance di crescita, un peggiore indice di conversione alimentare, determinando un aumento dell'impiego di antibiotici (Martelli *et al.*, 2009; Kyriakis *et al.*, 2001).

Un'altra importante sfida per il settore suinicolo è riduzione della morsicatura della coda, che ha importanti implicazioni sia sul benessere dei suini che sull'economia del settore (EFSA, 2007) 3-13 SUMMARY Council Directive 91/630/EEC 2 , as amended, laying down minimum standards for the protection of pigs, requires the Commission to submit to the Council a report, based on a scientific opinion of the European Food Safety Authority (EFSA). Le lesioni alla coda possono influire sul numero di carcasse condannate, sugli scarti alla macellazione e sulla riduzione del peso della carcassa, specialmente nel caso di lesioni gravi (Harley *et al.*, 2014). Nel complesso, sia i problemi respiratori che le lesioni alla coda sono considerati tra i maggiori fattori associabili ad una riduzione di performance. Tuttavia, non è ancora chiara la relazione che lega i problemi respiratori alla morsicatura della coda (EFSA, 2014). La morsicatura della coda è stata proposta come indicatore "iceberg" del livello di benessere animale in allevamento (Spoolder *et al.*, 2011). Le lesioni che ne derivano, costituiscono una via d'ingresso per i patogeni i quali, una volta entrati nel circolo ematico, possono diffondersi in diversi organi, inclusi i polmoni (Schröder-Petersen and Simonsen, 2001). Al contrario, i casi di morsicatura della coda aumentano esponenzialmente nel caso di animali malati, in quanto il soggetto morsicato è incapace di reagire al tentativo di morsicatura.

Alcuni studi hanno riscontrato che la presenza di lesioni alla coda, anche lievi, è stata

correlata alla presenza di pleuriti e polmoniti, e che il rischio aumenta con l'aumentare della severità delle lesioni (Harley *et al.*, 2014, 2012). Al contrario altri studi non hanno riscontrato questa corrispondenza (Munsterhjelm *et al.*, 2013; van Staaveren *et al.*, 2016) 95% CI 1.51-2.34.

Oltre a costituire un sito d'entrata per patogeni, la morsicatura della coda potrebbe essere associata a problemi respiratori poiché entrambe le condizioni possiedono simili fattori di rischio (EFSA, 2007). Ad esempio, uno stress prolungato è in grado di indebolire il sistema immunitario, contribuendo sia all'insorgere o all'aggravarsi di patologie, che di aumentare l'incidenza di lesioni alla coda (van Staaveren *et al.*, 2016). Tuttavia, queste relazioni sono difficili da dimostrare ed il dibattito scientifico attorno ad esse è ancora in corso.

L'obiettivo di questo studio è in primo luogo la valutazione della prevalenza e della gravità di lesioni polmonari, pleuriti e lesioni alla coda in 79 partite di suini macellati in un macello italiano. Il secondo obiettivo è quello di investigare eventuali relazioni esistenti tra queste lesioni e i parametri pre-macellazione (distanza dal macello, attesa pre-macellazione e stagione di macellazione) e di qualità della carcassa (peso della carcassa e percentuale di carne magra).

## MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nel periodo da giugno a dicembre 2019. Sono state valutate complessivamente 79 partite provenienti da 43 allevamenti diversi. Tutte le partite riguardavano suini destinati al circuito DOP del Prosciutto di Parma e San Daniele. I dati sono stati raccolti da giugno a dicembre 2019 in 11 giornate diverse. Gli allevamenti che hanno preso parte alla prova sono stati scelti a caso tra i fornitori del macello nel giorno del campionamento. Sulle partite sono stati valutati i seguenti parametri: lesioni anatomopatologiche, lesioni alla coda, parametri relativi al trasporto e alla pre-macellazione, qualità della carcassa. In Tabella 1 è possibile osservare la suddivisione delle partite nei fattori testati.

**Tabella 1.** Distribuzione e numerosità delle partite e delle carcasse ispezionate.

| Parametro                    | Classe   | Numero partite | Carcasse | Broncopolmoniti | Pleuriti | Code |
|------------------------------|----------|----------------|----------|-----------------|----------|------|
| Code                         | Tagliata | 79             | 10074    | 7492            | 7611     | 7731 |
| Distanza allevamento-macello | Breve    | 14             | 1763     | 1176            | 1193     | 1368 |
|                              | Media    | 47             | 6014     | 4555            | 4648     | 4665 |
|                              | Lunga    | 18             | 2297     | 1761            | 1770     | 1698 |
| Stagione                     | Estate   | 33             | 4185     | 3152            | 3199     | 3166 |
|                              | Inverno  | 46             | 5889     | 4340            | 4412     | 4565 |
| Attesa pre-macellazione      | Breve    | 54             | 6932     | 5247            | 5318     | 5267 |
|                              | Media    | 13             | 1631     | 1274            | 1310     | 1299 |
|                              | Lunga    | 12             | 1511     | 971             | 983      | 1165 |

Le lesioni anatomopatologiche comprendevano le lesioni osservate a livello polmonare e le pleuriti; sono state valutate dallo stesso osservatore, posto lungo la catena, durante tutta la prova. Le lesioni broncopolmonari sono state punteggiate, in ciascun lobo, con punteggio da 0 a 4 (dove 0 = assenza di lesione e 4 = lesioni a carico del lobo polmonare interessano una superficie di questo >75%), sino ad un massimo punteggio di 28, secondo il metodo Madec

and Derrien, (1981) (Tabella e Figura 1). Infine, è stato calcolato il valore medio delle lesioni broncopolmonari per partita (somma dei punteggi dei singoli punteggi polmonari/numero di polmoni esaminati) e la percentuale di superficie polmonare colpita.

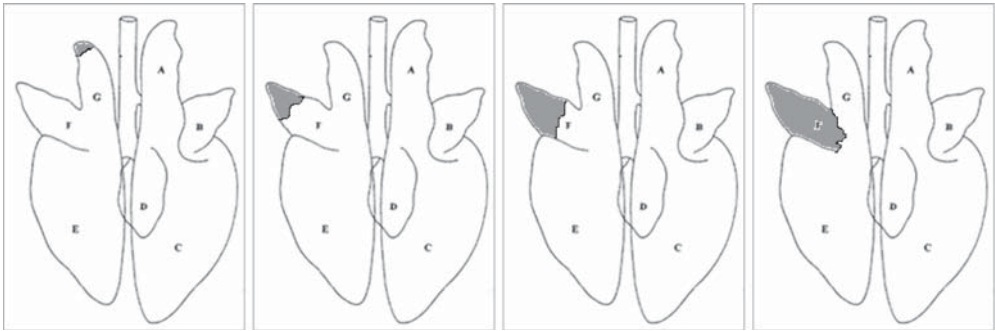
Le pleuriti sono state punteggiate impiegando la griglia SPES (*Slaughterhouse pleuritis evaluation system*) considerando una scala 0-4 a seconda dell'estensione e localizzazione delle pleuriti, secondo il metodo ideato da Dottori *et al.*, (2007). La griglia SPES fornisce due risultati: il valore medio SPES (somma dei singoli score pleurici/numero di polmoni valutati) che descrive il grado generale di pleurite della partita e l'indice APPI (*Actinobacillus pleuropneumoniae index*) che fornisce informazioni sulla prevalenza e gravità delle pleuriti dorso-caudali che risultano essere fortemente correlate a precedenti infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). L'indice APPI viene calcolato applicando la formula seguente: *frequenza delle lesioni dorso-caudali (con punteggio 2, 3 e 4) moltiplicato per la media calcolata considerando soltanto i polmoni con lesioni dorso-caudali (con punteggio 2, 3 e 4).*

**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;

La Tabella 2 illustra i principi di valutazione su cui si basa la griglia SPES con evidenziato il punteggio assegnato in relazione alla tipologia della lesione.

**Tabella 2:** griglia SPES per la valutazione delle Pleuriti Croniche  
**Table 2:** The SPES grid for Chronic Pleuritis scoring.

| Punteggio | Caratteristiche della lesione                                                                    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0         | Assenza di lesioni da PC                                                                         |
| 1         | Lesioni antero-ventrali: aderenze pleuriche tra lobi o ai bordi ventrali dei lobi                |
| 2         | Lesioni focali dorso-caudali monolaterali                                                        |
| 3         | Lesioni bilaterali di tipo 2 o lesioni monolaterali estese (almeno 1/3 di un lobo diaframmatico) |
| 4         | Gravi lesioni bilaterali estese (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici)                    |

Le lesioni alla coda sono state valutate sempre dallo stesso osservatore, posto in una posizione sopraelevata lungo la catena, in modo da poter agevolmente ispezionare la coda. Il punteggio è stato valutato utilizzando una scala 0-2 (0 = assenza di lesioni, 1 = morso superficiale sulla lunghezza della coda, senza evidenza di sangue 2= sangue fresco visibile sulla coda, presenza di crosta o assenza di parte della coda o gonfiore) secondo il metodo proposto dal Welfare Quality® (2009). I risultati di ciascuna partita sono stati espressi come prevalenza dei punteggi ottenuti (0, 1, 2). È stato successivamente calcolato un indice di lesione (tail index:  $[\% \text{ di lesioni pt } 1 + (2 \times \% \text{ lesioni tipo } 2)]$ ).

Per ciascuna partita è stata registrata la stagione di macellazione (E: da giugno a settembre, I: da ottobre a dicembre), la distanza di trasporto (DB = < 50 km, DM = 50-100 km, DL = > 100 km) e il tempo di attesa pre-macellazione (AB = < 3h; AM = 4-12 h; AL = > 12 h).

I dati ottenuti relativi alla qualità della carcassa sono stati il peso a freddo e la % di carne magra, quest'ultima ricavata dalla misurazione tramite Fat-o-Meater (OM-SFK, Copenhagen, Denmark). I risultati sono espressi sotto forma di media della singola partita.

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando i software Excel e R (R Core Team, 2017). L'unità statistica era la partita. La significatività statistica è stata settata a  $P \leq 0,05$ , mentre un  $P = 0.10$  è stato considerato una tendenza. Le analisi descrittive sono state eseguite utilizzando il pacchetto *psyc.ir* in R. Per verificare fenomeni di causa-effetto tra i diversi fattori, è stata fatta un'analisi GLM (pacchetto *Stats* in R) sui parametri di polmoniti, pleuriti e lesioni alla coda per verificare se ci fosse un effetto della distanza al macello, tempo di attesa pre-macellazione, della lunghezza della coda e della stagione. Successivamente è stato impostato un altro modello GLM per valutare se i parametri produttivi fossero influenzati da stagione, distanza allevamento-macello, tempo di attesa pre-macellazione, lesioni alla coda, polmoniti e pericarditi. Infine, la correlazione tra lesioni anatomopatologiche e lesioni alla coda è stata testata utilizzando le correlazioni di Spearman (pacchetto *Hmisc* in R).

## RISULTATI

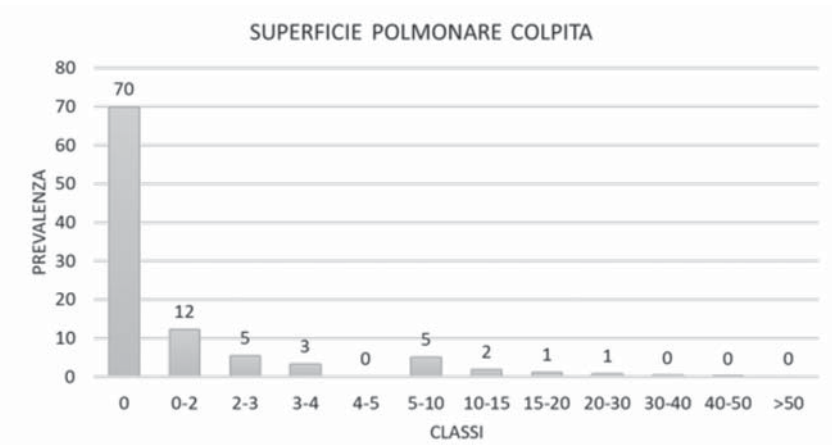
### Analisi descrittiva

Il peso medio delle carcasse a freddo è stato di 139.73 kg (DS 6.52, mediana 139.67); mentre la % di carne magra, ha era in media 51.26 % (DS 1.29, mediana 51.25).

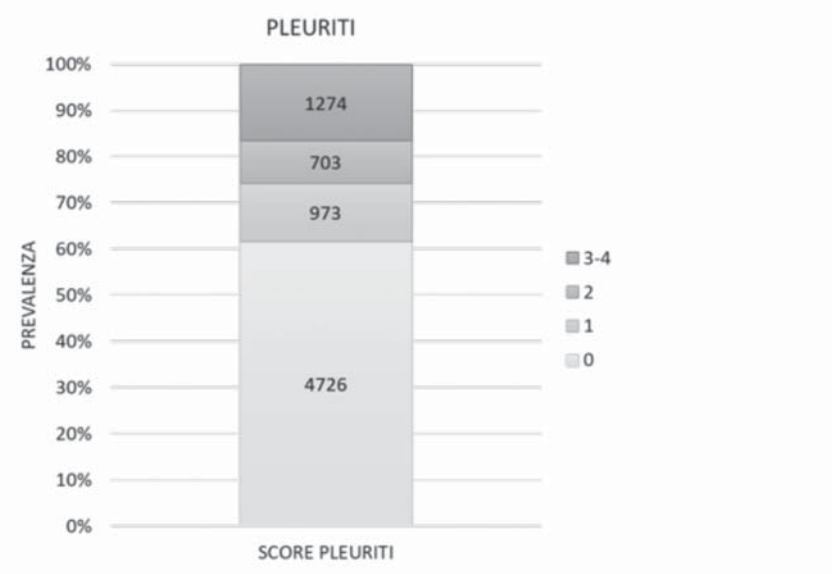
L'applicazione della griglia Madec ha evidenziato una prevalenza di lesioni broncopolmonari, compatibili con polmonite enzootica, del 30.2%. Le lesioni polmonari punteggiate per tutte le partite suine coinvolte nello studio, hanno ottenuto un punteggio medio (media Madec) di 0.91 (DS 1.8, mediana 0.16) con una superficie media colpita pari a 1.49% (DS 3.02, mediana 0.19, Fig. 2). Considerando tutte le partite punteggiate la prevalenza di pleuriti è risultata essere del 38.07% (Fig. 3). Questo dato costituisce un'informazione generale relativa alle lesioni pleuriche,

considerando sia le pleuriti ventro-craniali sia quelle dorso-caudali. La percentuali di pleuriti dorso-caudali, invece è risultata essere del 25.7%. Il punteggio medio SPES, è risultato 0.83 (DS 1.13, mediana 0,28); con un indice APPI medio di 0.70 (DS 0,39, mediana 0,66). La valutazione delle lesioni alla coda con punteggio pari a zero, è stata in media del 65.82% (DS 11.21, mediana 68.00), mentre le lesioni lievi hanno rappresentato il 29.64% (DS8.54, mediana 28.00) delle code, le lesioni gravi, hanno rappresentato il 4.44% delle lesioni totali (DS 5.02, mediana 3.00) (Fig. 3). Infine, l'indice di lesione (Coda index) è risultato pari a 38.52 su una scala di 0-200 (DS 15.13, mediana 36.00).

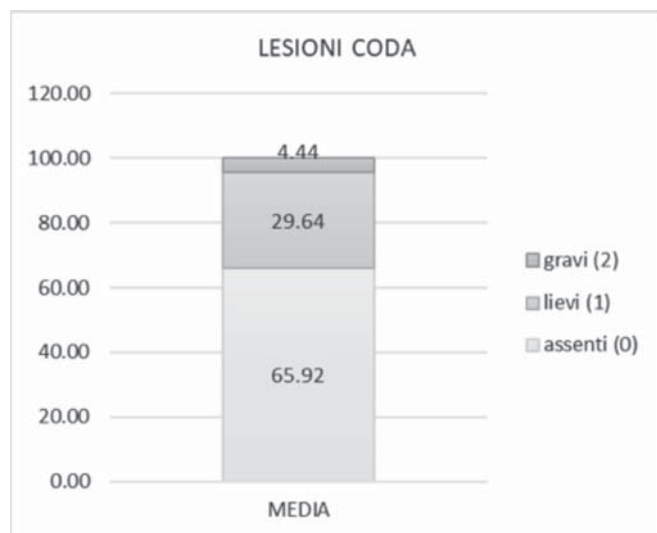
**Fig 2.** Percentuale di superficie colpita da lesioni polmonari. Ciascuna classe rappresenta la % di superficie polmonare interessata, mentre nell'asse verticale è rappresentata, per ciascuna classe la prevalenza riscontrata.



**Fig 3.** Prevalenza delle classi di pleuriti osservate.



**Fig 3.** Prevalenza delle classi di lesioni alla coda osservate.



### **Modello lineare generale misto**

I risultati hanno dimostrato che non vi è stato nessun effetto dei parametri testati (attesa pre-macellazione; distanza allevamento-macello; taglio della coda; stagione) sulle lesioni anatomo-patologiche studiate ( $P > 0.05$ ).

Le lesioni alla coda gravi sono risultate influenzate dalla distanza allevamento-macello, mostrando una maggiore prevalenza di lesioni gravi in trasporti inferiori a 50 km ( $P = 0.04$ ).

I parametri produttivi sono risultati influenzati sia dalle condizioni pre-macellazione, che dalla presenza di lesioni alla coda, polmonari e della pleura.

Il peso carcassa a freddo è risultato più elevato nelle partite provenienti da allevamenti situati a breve distanza ( $< 50$  km) dal macello ( $P < 0.04$ ) e con un'attesa pre-macellazione inferiore alle 12 ore ( $P = 0.01$  in AB). La presenza di pleuriti e polmoniti hanno avuto un effetto negativo sul peso della carcassa ( $P = 0.04$ ;  $P = 0.07$ ), mentre le lesioni alla coda non sono risultate significative.

La % di carne magra è risultata superiore in allevamenti situati a media e breve distanza ( $P = 0.0005$  e  $P = 0.0002$  rispettivamente). Al contrario, ad un ridotto tenore in carne magra è stata associata una maggiore prevalenza di lesioni polmonari e di lesioni alla coda ( $P = 0.03$  e  $P = 0.04$  rispettivamente).

### **Correlazioni**

I risultati non hanno evidenziato nessuna correlazione tra le lesioni alla coda e gli score polmonari ( $r^2 < 0.4$ ;  $P > 0.05$ ).

### **DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti nel presente lavoro forniscono un aggiornamento circa l'incidenza e la gravità delle lesioni polmonari riferibili a polmonite enzootica ed alle pleuriti riscontrate in suini all'età di macellazione. I suini oggetto del monitoraggio hanno evidenziato una prevalenza di lesioni broncopolmonari del 30.2 %.

Un dato, questo, in forte riduzione se comparato ai risultati di uno studio condotto nel 2008 (Meriardi et al., 2012) in Italia e recentemente confermato in Pangallo et al. (2019) riferibile al



2018, in cui la prevalenza delle lesioni broncopolmonari, riferibili a polmonite enzootica, era del 46,4% e del 46,0%, rispettivamente.

Per quanto riguarda la gravità delle lesioni osservate si riporta una lieve flessione della media Madec, pari a 0.91 nel presente studio, se comparata con quanto riportato negli stessi studi, dove la media Madec era risultata 1.03 e 1.09, rispettivamente.

Il dato di prevalenza osservato nel presente studio è probabilmente influenzato dalla distribuzione delle lesioni riferibili a polmonite enzootica nelle partite campionate nel progetto, si osserva infatti che la notevole riduzione della prevalenza non è accompagnata da una riduzione così marcata della media Madec. Questo indica che, a fronte di un minor numero di polmoni colpiti da polmonite enzootica, si osserva una maggiore estensione delle lesioni rispetto a precedenti osservazioni (Merialdi et al., 2012, Pangallo et al., 2019)

Per quanto riguarda il rilievo delle pleuriti, i dati ottenuti, indicano la presenza di pleuriti dorso-caudali (punteggio  $\geq 2$ ) nel 25.7% dei polmoni esaminati, fortemente indicative di precedenti infezioni da App. Questo dato, in accordo con la prevalenza del 25.1% riportata in Italia da Merialdi et al. (2012) per l'anno 2008 e con quella osservata negli anni successivi 2008 – 2011 riportata in Luppi et al. 2011, 24.2% e conferma l'importante incidenza delle pleuriti nella nostra realtà produttiva, in assenza di reali segnali di miglioramento nel tempo.

Un aspetto interessante è dato dalla percentuale totale delle pleuriti che nel presente studio si assesta al 38.4%. Anche questo dato appare in ulteriore calo se confrontato con i risultati ottenuti negli anni 2008-2011 che si attestava tra il 47.5% e il 42.5%, (Luppi et al. 2011, Merialdi et al. 2012). Appare evidente che rispetto alle precedenti osservazioni citate, la quota delle pleuriti dorso caudali è rimasta praticamente invariata, mentre quella relativa alle pleuriti ventro-craniali (punteggio 1) appare fortemente contratta.

È interessante sottolineare come le pleuriti croniche ventro-craniali siano per lo più da attribuire ad evoluzione cronica di infezioni da *M. hyopneumoniae* e a complicanze batteriche, tipiche della malattia respiratoria del suino o PRDC. Il dato quindi non sorprende se valutato considerando la forte riduzione della prevalenza di polmonite enzootica osservata nel presente studio e discussa all'inizio del paragrafo. I risultati della media SPES (0.83) e dell'indice APP (0.70) sono invece sovrapponibili a quanto riportato da Luppi et al. (2011) e Merialdi et al. (2012), (0.83 e 0.61 rispettivamente). Inoltre, le condizioni pre-macellazione non hanno influenzato, come atteso, l'occorrenza di lesioni polmonari e alla pleura, che pertanto restano riconducibili alle condizioni igienico-sanitarie riferibili agli allevamenti di origine (Jäger et al. 2012; Sanchez-Vazquez et al., 2010; Čobanović et al., 2019).

I report riscontrati sulla prevalenza delle lesioni alla coda in Europa, mostrano grandi differenze tra i vari Paesi europei negli anni (EFSA, 2007), con una variabilità dal 72.5% nel 2014 (Harley et al., 2014) al, più recente, 20-30% nel 2016 e 2017 rispettivamente (Carroll et al., 2016; van Staaveren et al., 2017). Il dato emerso dal presente studio, considerando la somma di lesioni lievi (29.64%) e gravi (4.44%) appare in linea con i dati raccolti negli ultimi anni (vom Brocke et al., 2019). Al contrario, in confronto con un recente studio italiano, la prevalenza delle lesioni alla coda riscontrate nel presente studio, risulta nettamente superiore (Maisano et al., 2020).

Lo studio dell'interazione tra i fattori ha evidenziato un'associazione tra la maggiore presenza di pleuriti e polmoniti e diminuzione del peso a freddo della carcassa, giustificabile da un lato con gli effetti negativi dello stress causato dal dolore cronico sulla crescita (Walker and Bilkei, 2006; Sinisalo et al., 2012) e sull'indice di conversione alimentare (Heinonen et al., 2012; Valros et al., 2013); dall'altro con il catabolismo muscolare indotto dallo stato infiammatorio acuto o persistente (Beisel, 1975).

Al contrario, ad una maggiore prevalenza sia di lesioni polmonari che di lesioni alla coda è stato associato un ridotto tenore percentuale in carne magra. Questo risultato conferma quanto riportato in letteratura circa gli effetti dello stress sul metabolismo dei lipidi e delle proteine

(Dokmanovic *et al.*, 2015; Foury *et al.*, 2007; Skrlep *et al.*, 2009). Infatti, è noto che concentrazioni elevate di cortisolo favoriscano la lipogenesi e incrementino il catabolismo proteico, quindi muscolare (Mormede, 2007), risultando in un lieve aumento di massa grassa, che tuttavia non ha avuto impatto commerciale nelle partite osservate.

In aggiunta agli aspetti anatomo-patologici, i parametri produttivi sono stati influenzati da condizioni pre-macellazione, quali la distanza dal macello e l'attesa pre-macellazione. In particolare, la % di carne magra è risultata superiore in allevamenti situati a media (50-100 km) e breve (< 50 km) distanza. Secondo uno studio condotto da O'Brien (1998) un trasporto di breve distanza costituisce una fonte di stress acuto che può portare ad un incremento dell'attività osmotica (dovuta verosimilmente ai prodotti terminali dell'ipermetabolismo), causando un'emoconcentrazione e un aumento del contenuto idrico all'interno delle fibre muscolari (O'Brien, 1998), con conseguente aumento temporaneo, della quantità di carne magra. Tuttavia, il presente studio non ha preso in considerazione parametri di qualità della carne (es. drip loss), pertanto ulteriori approfondimenti sarebbero necessari per confermare questa ipotesi.

Infine, le lesioni polmonari e le lesioni alla coda sono risultate non correlate, come invece diversamente riportato in letteratura (Teixeira *et al.*, 2016). Tuttavia, il dato riflette la complessa eziologia del comportamento di morsicatura della coda e la natura multifattoriale delle patologie respiratorie, in accordo con quanto osservato nello studio di van Staaveren *et al.*, (2016).

## CONCLUSIONI

Il presente studio ha evidenziato come la presenza di broncopolmoniti abbia mostrato una riduzione rispetto agli studi precedenti, mentre la prevalenza e la gravità delle pleuriti dorso-caudali sia rimasta costante. La prevalenza di lesioni alla coda è risultata in linea con le medie europee. Il peso della carcassa è risultato negativamente influenzato dalla presenza di lesioni broncopolmonari e pleuriti. Le lesioni alla coda e polmonari, assieme alle condizioni di pre-macellazione hanno influenzato il contenuto in carne magra, evidenziando l'effetto che lo stress nelle fasi premacellazione può avere sulla qualità della carcassa.

## RINGRAZIAMENTI

I dati presentati sono stati raccolti nell'ambito del Progetto Filiera F61 – Reg. (UE) 1305/2013 – PSR 2014/2020 DGR Emilia-Romagna n. 227/2017 e s.m.i. - FOCUS AREA 3A - Operazione 16.2.01 con capofila Fontane del Duca. Si ringrazia per la collaborazione il macello partner del progetto.

## BIBLIOGRAFIA

1. Beisel, W.R. (1975). "Metabolic response to infection". Annual review of medicine 26, 9-20.
2. Carroll, G.A., Boyle, L.A., Teixeira, D.L., Van Staaveren, N., Hanlon, A., O'Connell, N.E (2016). Effects of scalding and dehairing of pig carcasses at abattoirs on the visibility of welfare-related lesions. Animal 10, 460–467.
3. Čobanović, N., Jamnikar-Ciglenečki, U., Kirbiš, A., Križman, M., Štukelj, M. and Karabasil, N. (2019). Impact of various housing conditions on the occurrence of pathological lesions in slaughtered pigs. Veterinarski glasnik 73, 17-29.
4. Dokmanovic, M., Baltic, M.Z., Duric, J., Ivanovic, J., Popovic, L., Todorovic, M., Markovic, R. and Pantic, S. (2015). "Correlations among stress parameters, meat and carcass quality parameters in pigs". Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 28, 435.
5. Dottori, M., Nigrelli, A.D., Bonilauri, P., Merialdi, G., Gozio, S., Cominotti, F., (2007). "Proposta per un nuovo sistema di punteggiatura delle pleuriti suine in sede di macellazione. La griglia SPES (Slaughterhouse Pleurisy Evaluation System)". Large Animal Review 13, 161–165.

6. EFSA (2011). "Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine)". EFSA J. 9, 2351.
7. EFSA, (2007). "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. 611, 1–109.
8. EFSA, (2014). "Scientific Opinion concerning a Multifactorial approach on the use of animal and non-animal-based measures to assess the welfare of pigs". EFSA J. 12, 3702.
9. Foury, A., N. A. Geverink, M. Gil, M. Gispert, M. Hortos, M. Font, I. Furnols, D. Carrion, S. C. Blott, G. S. Plastow, P. Mormede (2007). "Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the relationship with carcass composition". *Animal* 1, 973-982.
10. Harley, S., Boyle, L.A., O'Connell, N.E., More, S.J., Teixeira, D.L., Hanlon, A., (2014). "Docking the value of pigmeat? Prevalence and financial implications of welfare lesions in Irish slaughter pigs". *Anim. Welf.* 23, 275–285.
11. Harley, S., More, S., Boyle, L., O'Connell, N., Hanlon, A., (2012). "Good animal welfare makes economic sense: Potential of pig abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool". *Ir. Vet. J.* 5 (1,11).
12. Heinonen, M., Orro, T., Kokkonen, T., Munsterhjelm, C., Peltoniemi, O., Valros, A. (2010). "Tail biting induces a strong acute phase response and tail-end inflammation in finishing pigs". *Vet J.* 184, 303–307.
13. Jäger, H.C., McKinley, T.J., Wood, J.L., Pearce, G.P., Williamson, S., Strugnell, B., Done, S., Habernoll, H., Palzer, A., Tucker, A. W. (2012). Factors associated with pleurisy in pigs: a case-control analysis of slaughter pig data for England and Wales. *PloS One*, 7(2): e29655.
14. Kyriakis, S.C., Alexopoulos, C., Vlemmas, J., Sarris, K., Lekkas, S., Koutsoviti-Papadopoulou, M., Saoulidis, K., (2001). "Field study on the efficacy of two different vaccination schedules with HYORESP in a *Mycoplasma hyopneumoniae* infected commercial pig unit". *Journal of Veterinary Medicine B. Infectious Diseases and Veterinary Public Health* 48, 675–684.
15. Luppi, A., Bonilauri, P., Merialdi, G., & Dottori, M. (2011). "Update on the monitoring of pleural lesions at slaughterhouse using the SPES grid in Italian slaughtered pigs. In *Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXXVII Meeting Annuale, Piacenza, Italia, 24-25 Marzo 2011*" (pp. 306-311). Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS).
16. Madec, F., Derrien, H., 1981. "Fréquence, intensité et localisation des lésions pulmonaires chez le porc charcutier: Résultats d'une première série d'observations en abattoir". *Journées de la Recherche Porcine en France* 13, 231–236.
17. Maisano, A.M., Luini, M., Vitale, N., Nodari, S.R., Scali, F., Alborali, G.L. and Vezzoli, F., 2020. Animal-based measures on fattening heavy pigs at the slaughterhouse and the association with animal welfare at the farm level: a preliminary study. *animal* 14, 108-118.
18. Martelli, P., Gozio, S., Ferrari, L., Rosina, S., De Angelis, E., Quintavalla, C., (2009). "Efficacy of a modified-live porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccine in pigs naturally exposed to a heterologous European (Italian cluster) field strain: Clinical protection and cell-mediated immunity". *Vaccine* 27, 3788–3799.
19. Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., Martelli, P (2012). "Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors". *Vet. J.* 193, 234–239.
20. Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G. and Richard, S. (2007). "Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare". *Physiology & behavior* 92, 317-339.

21. Munsterhjelm, C., Simola, O., Keeling, L., Valros, A., Heinonen, M., (2013). "Health parameters in tail biters and bitten pigs in a case-control study". *Animal* 7 (5), 814-821.
22. O'Brien, P.J. (1998). "La mutazione responsabile della sindrome da stress del suino." *Large Animals Review* 4, 3.
23. Pangallo G., Bonilauri P., De Lorenzi G., Luppi A., Dottori M. (2019) "Polmonite enzootica: monitoraggio delle lesioni broncopolmonari in suini macellati nel periodo 2012-2018. In Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini, XXXVII Meeting Annuale, Piacenza, Italia, 21-22 Marzo 2019 (pp. 187-192)." Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini (SIPAS).
24. Sanchez-Vazquez, M. J., Smith, R. P., Kang, S., Lewis, F., Nielen, M., Gunn, G. J., Edwards, S. A. (2010). "Identification of factors influencing the occurrence of milk spot livers in slaughtered pigs: a novel approach to understanding *Ascaris suum* epidemiology in British farmed pigs". *Veterinary Parasitology* 173, 271-279.
25. Schröder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., (2001). "Tail biting in pigs". *Vet. J.* 162 (3), 196-2010.
26. Sinisalo, A., Niemi, J.K., Valros, A., Heinonen, M. (2012). "Tail biting and production performance in fattening pigs." *Livest Sci*, 14, 220–225.
27. Škrlep, M., Prevonlik, M., Segula, B. and Candek-Potokar, M. (2009). "Association of plasma stress markers at slaughter with carcass or meat quality in pigs". *Slovenian Veterinary Research* 46, 133-142.
28. Spoolder, H.A.M., Bracke, M.B.M., Mueller-Graf, C., Edwards, S., (2011). "Technical report submitted to EFSA. Preparatory work for the future development of animal based measures for assessing the welfare of pigs. Report 2: Preparatory work for the future development of animal based measures for assessing the welfare of weaned, growing and fattening pigs including aspects related to space allowance, floor types tail biting and need for tail docking" Available from <http://www.efsa.europa.eu/de/supporting/pub/181e>.
29. Teixeira, D., Harley, S., Hanlon, A., O'Connell, N.E., More, S., Manzanilla, E., Boyle, L. (2016). "Study on the association between tail lesion score, cold carcass weight and viscera condemnations in slaughter pigs". *Front. Vet. Sci.* 3, 24.
30. Teixeira, D.L., Harley, S., Hanlon, A., O'Connell, N.E., More, S.J., Manzanilla, E.G., Boyle, L.A., (2016). "Study on the association between tail lesion score, cold carcass weight, and viscera condemnations in slaughter pigs." *Front. Vet. Sci.* 3, 24.
31. Valros, A., Munsterhjelm, C., Puolanne, E., Ruusunen, M., Heinonen, M., Peltoniemi, O.A. and Pösö, A.R. (2013). "Physiological indicators of stress and meat and carcass characteristics in tail bitten slaughter pigs". *Acta Veterinaria Scandinavica* 55, 75.
32. van Staaveren, N., Teixeira, D.L., Hanlon, A., Boyle, L.A (2017). "Pig carcass tail lesions: the influence of record keeping through an advisory service and the relationship with farm performance parameters". *Animal* 11, 140–146.
33. van Staaveren, N., Vale, A.P., Manzanilla, E.G., Teixeira, D.L., Leonard, F.C., Hanlon, A., Boyle, L.A., (2016). "Relationship between tail lesions and lung health in slaughter pigs". *Prev. Vet. Med.* 127, 21–26.
34. Vom Brocke, A.L., Karnholz, C., Madey-Rindermann, D., Gauly, M., Leeb, C., Winckler, C., Schrader, L. and Dippel, S. (2019). "Tail lesions in fattening pigs: Relationships with post-mortem meat inspection and influence of a tail biting management tool". *animal*, 13, 835-844.
35. Walker, P.K., Bilkei, G. (2006). "Tail-biting in outdoor pig production." *Vet J* 171, 367–369.



**PREMIO  
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2020  
VINCITORE**





# VALUTAZIONE DELLA PRESENZA DEL VIRUS DELL'EPATITE E (HEV) IN UN ALLEVAMENTO A CICLO CHIUSO DEL NORD ITALIA

## EVALUATION OF THE PRESENCE OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN A FARROW-TO-FINISH HERD IN NORTHERN ITALY

BINI G.<sup>1</sup>, DI BARTOLO I.<sup>2</sup>, OSTANELLO F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, 00161, Roma, Italy

**Parole chiave:** virus dell'epatite E, HEV, suini, sorveglianza

**Keywords:** Hepatitis E virus, HEV, swine, surveillance

### RIASSUNTO

Il virus dell'epatite E (HEV) è un virus a RNA, unico membro della famiglia *Hepeviridae*. Nei Paesi in via di sviluppo l'infezione è endemica e si trasmette per via oro-fecale attraverso il consumo di acqua contaminata. Nei Paesi industrializzati la malattia è considerata una zoonosi emergente, correlata al consumo di prodotti contaminati a base di carne e/o fegato di suino o cinghiale, crudi o poco cotti. I suidi domestici e selvatici sono considerati i principali *reservoir* di HEV nei Paesi industrializzati dal momento che i ceppi da essi isolati sono filogeneticamente correlati con quelli umani. La prevalenza di allevamenti infetti è elevata sia in Italia sia in altri Paesi. Nei suini l'infezione da HEV decorre in modo asintomatico e quindi non vi è interesse economico nel tentare di controllarla. L'obiettivo dello studio è stato quello di indagare la presenza di HEV in un allevamento di suini del nord-Italia, mai esaminato in precedenza. Nell'arco di un anno sono stati raccolti 59 campioni fecali da animali di differenti fasce d'età e 3 pool di emosieri testicolari (PF). I campioni fecali sono stati analizzati tramite RT-PCR al fine di rilevare il genoma virale mentre nei PF sono stati ricercati anticorpi anti-HEV utilizzando un kit ELISA. I risultati ottenuti mostrano una situazione atipica all'interno dell'allevamento dove, a fronte di una sieropositività fra le scrofe, l'RNA virale non è stato messo in evidenza nei campioni fecali degli animali di tutte le fasce d'età. Alla luce di questi risultati sono state discusse tre diverse ipotesi: una falsa positività al test ELISA, una bassa prevalenza di animali eliminatori o un'effettiva circolazione di HEV limitata alle scrofe con successiva eradicazione del virus. L'ipotesi più probabile sembra essere l'ultima ma questo pone ulteriori interrogativi sulla reale prevalenza di HEV negli allevamenti, così come sulla sua epidemiologia.

### ABSTRACT

Hepatitis E virus (HEV) is an RNA virus, the only member of the *Hepeviridae* family. In developing countries, the infection is endemic and is transmitted via the faecal-oral route through the consumption of contaminated water. In industrialized countries the disease is an emerging zoonosis, related to the consumption of contaminated raw or undercooked meat and/or liver products of pig or wild boar. In developed countries, domestic and wild pigs are considered the main *reservoirs* of HEV since the strains isolated from them are phylogenetically correlated with human ones. The prevalence of infected farms is high both in Italy and in other countries. In pigs, HEV infection is asymptomatic and therefore farmers have no economic interest in trying to control it. The aim of the study was to investigate the

presence of HEV inside a pig farm in Northern Italy, never examined previously. Over a year, 59 faecal samples (individual and pooled) were collected from animals of different age groups and three processing fluids (PF) taken at the time of castration. Faecal samples were analysed by RT-PCR in order to detect the viral genome while anti-HEV antibodies were detected in PF using a commercial ELISA kit. The results obtained show an atypical situation inside the farm where the sows are anti-HEV positive in PF while the search for viral RNA in the stool samples has given negative results in all age groups. On the basis of these results, three different hypotheses have been formulated: a false positivity to the ELISA test, a low prevalence of infected animals or a circulation of single HEV in sows. The most probable hypothesis seems to be the last but this raises further questions on the real prevalence of HEV in farms, as well as on its epidemiology.

## INTRODUZIONE

Il virus dell'epatite E (HEV) è causa di epatite negli animali e nell'uomo (Purcell e Emerson, 2008). HEV è un RNA virus a singolo filamento dotato di quasi-envelope classificato nella famiglia *Hepeviridae*, genere *Orthohepevirus* (Purdy *et al.*, 2017). Le specie del genere *Orthohepevirus A* comprendono 8 genotipi (da HEV-1 a HEV-8) in grado di infettare l'uomo ed altri mammiferi. Solo i ceppi appartenenti ai genotipi da HEV-1 a HEV-4 sono stati messi in evidenza in Europa.

HEV-1 e HEV-2 infettano solo l'uomo, sono endemici in molti Paesi in via di sviluppo dove causano focolai epidemici di epatite acuta, generalmente correlati al consumo di acqua contaminata da feci e alle scadenti condizioni igienico-sanitarie. In questi Paesi, HEV è la causa più comune di epatite virale acuta ed è responsabile di circa 20 milioni di casi ogni anno, di cui 70.000 letali. I ceppi appartenenti ai genotipi HEV-3 e HEV-4 sono zoonosici. In Europa, i casi umani di epatite E causati da HEV-1 e HEV-2 vengono messi in relazione con soggiorni in aree endemiche (Paesi in via di sviluppo). Tuttavia, negli ultimi 10 anni, è stato descritto un numero crescente di casi umani di epatite E autoctoni, causati dalla trasmissione zoonosica dei genotipi HEV-3 e HEV-4 (Aspinall *et al.*, 2017). In Europa, la trasmissione alimentare di HEV-3 e HEV-4 sembra essere una delle principali modalità di infezione ed è correlata al consumo di prodotti a breve stagionatura (principalmente salsicce contenenti fegato di suino) e carne poco cotta di cinghiale (Kamar *et al.*, 2017).

I suidi (domestici e selvatici) rivestono quindi un ruolo centrale nell'epidemiologia della malattia in quanto riconosciuti come *reservoir* di HEV nei Paesi industrializzati.

Se nell'uomo la malattia può assumere differenti manifestazioni cliniche – da asintomatica fino a casi di insufficienza epatica acuta – nel suino e negli altri *reservoir* la patologia è sempre a carattere subclinico con lesioni epatiche rilevabili solamente a livello istologico. Anche nel suino, l'infezione ha un ciclo oro-fecale. Si ritiene che, in genere, l'immunità passiva materna protegga i suinetti dall'infezione fino a circa due mesi di età. Successivamente, la maggior parte degli animali si infetta mediante l'assunzione di feci o di materiale contaminato presente nell'ambiente. Di conseguenza, la prevalenza più elevata si osserva in animali di età compresa fra i 2 e 4 mesi.

La presenza di HEV-3, il genotipo più frequente in Europa, è stata largamente descritta nelle popolazioni di suini (Pavio *et al.*, 2017). La trasmissione all'uomo può quindi essere favorita dall'elevata prevalenza di aziende e capi infetti.

In Europa, la sieroprevalenza intra-aziendale per HEV varia dal 30% al 98% (Salines *et al.*, 2017), con alcune differenze relative ai singoli Paesi (Casas *et al.*, 2009, Lange *et al.*, 2017, Rose *et al.*, 2011). Anche la prevalenza di animali infetti è molto variabile: da un minimo del 10% fino a un massimo del 100% (Salines *et al.*, 2017). Tuttavia,

la comparazione dei dati epidemiologici a livello internazionale è resa difficile dalla mancanza di un gold standard nella diagnosi.

A causa delle implicazioni di sanità pubblica e della sua grande diffusione nelle popolazioni di suini, è importante determinare la prevalenza di allevamenti infetti. Sono quindi necessari programmi di sorveglianza per HEV allo scopo di acquisire maggiori conoscenze sulla presenza, prevalenza e caratteristiche dei ceppi circolanti negli allevamenti, al fine di implementare eventuali misure di controllo con lo scopo di ridurre il rischio di infezione nei suini e, di conseguenza, il rischio di trasmissione di HEV all'uomo (EFSA, 2017, Salines *et al.*, 2017).

Uno dei maggiori problemi legati alla presenza di HEV all'interno degli allevamenti suini è che il virus può persistere nell'ambiente, incrementando il rischio che gli animali possano infettarsi tardivamente o re-infettarsi, aumentando così la probabilità che vengano macellati suini viremici. La macellazione di animali viremici rappresenta uno dei fattori di rischio principali per la trasmissione zoonosica dell'infezione attraverso il consumo di carni o organi (in particolare il fegato) freschi o prodotti a breve stagionatura (es. salsicce, in particolare quelle che contengono fegato).

Inoltre, risulta importante l'interazione fra HEV, Circovirus suino tipo 2 (PCV2) e il virus della Sindrome Riproduttiva Respiratoria del suino (PRRSV). La co-infezione con questi virus sembra causare un aumento della quantità di particelle di HEV escrete con le feci e un allungamento della finestra di eliminazione. Anche in questo caso, la conseguenza sarebbe un aumento della probabilità che i suini arrivino infetti all'età di macellazione.

L'assenza di una normativa specifica (sia a livello nazionale che Comunitario) relativa all'infezione negli allevamenti suini, associata al fatto che HEV è poco o nulla patogeno per il suino, rende questo virus economicamente poco rilevante per gli allevatori che quindi non hanno interesse a controllarne la circolazione all'interno degli allevamenti intensivi.

È evidente che la riduzione del rischio per il consumatore deve focalizzarsi sulla diminuzione della probabilità che la carne e gli organi di suini infetti entrino nel circuito delle carni e dei prodotti a base di carne. In termini di misure di salvaguardia della salute del consumatore e secondo un principio di massima precauzione, la valutazione della prevalenza degli animali infetti al macello appare poco efficace e, potenzialmente, estremamente costosa. Un'alternativa potrebbe essere rappresentata dall'individuazione di allevamenti indenni o a bassa prevalenza che possano rappresentare la fonte di una filiera HEV-free.

Lo scopo dello studio è stato quello di rilevare il virus dell'epatite E in un allevamento intensivo a ciclo chiuso mai esaminato in precedenza.

## **MATERIALI E METODI**

### *Allevamento*

La ricerca è stata condotta in una azienda a ciclo chiuso del nord Italia, con circa 300 scrofe e 5000 capi mediamente presenti. L'allevamento, che da circa sei anni pratica una rimonta esclusivamente interna, è gestito a bande tri-settimanali. Il seme viene acquistato da centri genetici. L'azienda è positiva stabile nei confronti di PRRSV; i riproduttori vengono vaccinati nei confronti di PRRSV e i suinetti nei confronti di PCV2.

### *Campioni esaminati*

Al fine di valutare l'eventuale presenza di HEV in allevamento, nel periodo marzo 2018 - gennaio 2019 sono stati raccolti tre tipologie di campioni: pool di feci, feci individuali e pool di emosieri testicolari (PF).

I pool di feci degli animali da ingrasso sono stati prelevati dalle seguenti classi di età: 2 da soggetti di circa 40 giorni di vita; 33 da animali di 60-100 giorni di vita (categoria a maggiore

rischio); 4 da suini di 140 giorni di vita e 8 da animali di circa 170 giorni di vita.

I pool sono stati costituiti raccogliendo direttamente dal pavimento dei box che ospitavano gli animali (circa 25 capi/box), 3-5 campioni individuali di feci fresche. I campioni individuali sono andati a costituire un pool, di circa 150 grammi.

Per quanto riguarda i riproduttori, sono stati prelevati 12 campioni individuali da altrettante scrofe presenti in due distinte sale parto. Complessivamente, sono stati raccolti 59 campioni fecali (47 pool e 12 individuali). I campioni fecali sono stati posti all'interno di un sacchetto di polietilene, trasportati in condizioni di refrigerazione fino all'arrivo al laboratorio e successivamente congelati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

Sono stati inoltre prelevati 3 pool di emosieri testicolari (PF). Ogni PF era composto dagli emosieri ricavati dai testicoli di tutti i suinetti maschi nati (complessivamente 91) da cinque diverse scrofe (per un totale di 25 scrofe con numero di parto compreso tra 2 e 9. Dopo la raccolta, gli emosieri sono stati congelati a -20°C fino all'esecuzione delle analisi.

#### *Ricerca del genoma di HEV*

I campioni fecali raccolti sono stati analizzati con metodica RT-PCR al fine di rilevare l'eventuale presenza dell'RNA virale. Per l'estrazione dell'RNA, le feci sono state sospese in acqua bidistillata sterile (10% p/v) e successivamente centrifugate a 6000 g per 10 minuti. L'RNA è stato estratto a partire da 140 µL di sospensione utilizzando il QIAamp® Viral RNA mini kit (QIAGEN, Milano) ed eluito in 80 µL di acqua *RNase-free*. Successivamente si è proceduto con il protocollo di retrotrascrizione e amplificazione usando il kit RT-PCR OneStep QIAGEN® (QIAGEN, Milano). Per rilevare l'RNA di HEV è stato impiegato un protocollo di nested RT-PCR condotto utilizzando la coppia di primer HE40-HE044, amplificando così un frammento di 506 paia di basi appartenente alla regione del capsido. I campioni sono stati poi sottoposti a un protocollo di nested PCR utilizzando una DNA polimerasi e la coppia di primer HE110-HE041 che amplifica un frammento di 458 paia di basi. La PCR è stata eseguita come segue: un ciclo a 94°C per 9 minuti seguito da 35 cicli a 94°C per 45 secondi, 49°C per 45 secondi e 72°C per 1 minuti; la fase di allungamento per 7 minuti a 72°C.

#### *Ricerca di anticorpi specifici anti-HEV*

Per la ricerca degli anticorpi anti-HEV negli emosieri testicolari (PF) è stato utilizzato un kit ELISA commerciale (HEV-Ab, Wantai Biopharmaceutical Inc., Beijing, China). Come specificato dal produttore, il valore di cut-off è stato calcolato come media dei valori di densità ottica (OD) di tre sieri di controllo negativi (forniti con il kit) + 0,12. I PF che hanno restituito un valore di assorbanza maggiore del valore del cut-off sono stati considerati positivi alla ricerca di anticorpi specifici anti-HEV.

### **RISULTATI**

La ricerca di HEV-RNA ha fornito un risultato negativo sia nei campioni fecali individuali delle scrofe sia nei pool di feci degli animali da ingrasso. Al contrario, i 3 campioni di emosiero testicolare hanno fornito risultati nettamente positivi, con valori di densità ottica (OD) compresi tra 2,760 e 2,806, ampiamente superiori al valore di cut-off (0,155).

### **DISCUSSIONE**

I risultati ottenuti indicano una situazione insolita all'interno dell'allevamento. A fronte dell'assenza dell'RNA virale nei campioni fecali (prelevati sia dai riproduttori sia dagli animali da ingrasso di diverse fasce di età) è stata rilevata la presenza di anticorpi

specifici anti-HEV nei PF, indicativa della presenza di immunoglobuline nel colostro e, di conseguenza, di una condizione di sieropositività delle scrofe esaminate. Nel complesso, i risultati ottenuti portano ad ipotizzare la presenza di una immunità specifica anti-HEV nei riproduttori esaminati, in assenza di circolazione virale nei soggetti all'ingrasso. Alla luce di questi risultati contrastanti è possibile formulare alcune ipotesi.

La prima ipotesi è che i risultati ottenuti dall'esame sierologico dei PF siano dei falsi positivi. Questa ipotesi appare poco probabile in quanto il kit ELISA utilizzato è considerato uno dei migliori, in termini di attendibilità diagnostica, tra quelli commercialmente disponibili. Nell'uomo, la sensibilità diagnostica di questo kit ELISA è di circa il 97% con una specificità del 99%. Inoltre, al momento non sono noti altri patogeni del suino che, presentando determinanti antigenici in comune con HEV, possano causare cross-reattività sierologiche.

La seconda ipotesi è che HEV circoli in allevamento ma con una prevalenza estremamente bassa. In questa situazione, la numerosità dei campioni esaminati potrebbe essere stata insufficiente a rilevare la presenza del genoma di HEV in almeno uno di questi. Per aumentare la probabilità di rilevazione di HEV, la maggioranza dei pool fecali esaminati (33/47; 70%) è stata prelevata da animali di età compresa tra 60 e 100 giorni di vita, fascia di età in cui è più probabile rilevare animali eliminatori fecali del virus. Ipotizzando un numero di soggetti di questa fascia di età presenti in allevamento pari a 2000 capi, la massima prevalenza possibile, a fronte di nessun campione positivo su 33 esaminati, può essere calcolata utilizzando la seguente formula (Thrusfield, 2018): dove  $D$  è il numero massimo di animali positivi,  $n$  il numero di campioni esaminati tutti con esito negativo (33),  $N$  il numero di animali presenti (2000) e  $CL$  è il livello di confidenza (95%).

Nel nostro caso, la massima prevalenza possibile è dell'8,6%. Una prevalenza così bassa per HEV nei soggetti di questa fascia di età non è mai stata segnalata in precedenza all'interno di allevamenti infetti. Alla luce di questi rilievi è quindi improbabile che nell'allevamento preso in esame la prevalenza nei soggetti di 2-3 mesi di età sia così bassa.

La terza ipotesi è che HEV sia entrato nell'allevamento, abbia circolato tra le scrofe senza diffondersi alle altre categorie di animali e che, successivamente, l'infezione si sia esaurita. L'allevamento è però a ciclo chiuso con una rimonta esclusivamente interna da sei anni. In assenza di acquisto di riproduttori dall'esterno, l'esatta via di introduzione del virus è difficile da stabilire. Il virus potrebbe essere entrato mediante un contatto con suini selvatici, oppure veicolato dagli operai che lavorano nell'azienda. Queste ipotesi sono state escluse considerando la localizzazione geografica dell'azienda e le misure di biosicurezza adottate e comunque spiegherebbero l'ingresso del virus in allevamento ma non per quale motivo si sia diffuso solo alle scrofe senza coinvolgere gli animali all'ingrasso. Un recente studio (Li *et al.*, 2019) ha evidenziato la presenza dell'RNA virale nel seme di verro suggerendo quindi l'ipotesi che la fecondazione artificiale possa essere una ulteriore via di trasmissione. Se il materiale genetico viene acquistato all'esterno da centri genetici, si potrebbero delineare nuove modalità di ingresso del virus in allevamento, in particolare nel settore di riproduzione. Tuttavia, la trasmissione per via venerea non è ancora stata dimostrata. Occorre inoltre considerare anche i motivi per i quali il virus non si è diffuso ad altri settori dell'allevamento. È possibile che le rigide misure di biosicurezza e le pratiche igienico sanitarie attuate nell'allevamento possano aver confinato l'infezione nel solo settore riproduzione. Ciò potrebbe aver contribuito a interrompere la persistenza dell'infezione in allevamento: le scrofe hanno esaurito l'infezione, vi è stata la clearance virale e, contestualmente, è stata evitata la persistenza del virus in sala parto e la sua diffusione ad altri settori mediante l'adozione di efficaci pratiche di pulizia e disinfezione e l'applicazione di corrette misure di biosicurezza. Una ulteriore possibilità è che non siano

stati rilevati dei campioni fecali positivi prelevati dalle scrofe semplicemente perché il numero di campioni esaminati non era sufficiente. Con 300 scrofe presenti in allevamento, la massima prevalenza possibile a fronte di zero campioni positivi su 12 esaminati è del 22%. Se la prevalenza in questi animali fosse inferiore a questo valore, il numero di campioni esaminati sarebbe troppo basso per avere il 95% di probabilità di rilevare almeno un campione positivo fra i 12 esaminati (Thrusfield, 2018).

Considerando i risultati ottenuti, è altamente probabile che nel settore ingrasso di questo allevamento il virus non circoli fra gli animali. Qualche dubbio rimane per il settore riproduzione ma resta il fatto che nello scenario peggiore, rappresentato dall'infezione dei riproduttori, le misure di biosicurezza hanno probabilmente impedito la diffusione del virus negli altri settori. Al momento, è quindi possibile considerare l'allevamento HEV-free. Per tale motivo, i risultati di questo lavoro delineano una situazione relativamente inconsueta. Precedenti studi condotti nel nord Italia allo scopo di valutare la prevalenza di allevamenti infetti (Di Bartolo *et al.*, 2008; Monne *et al.*, 2015; Caruso *et al.*, 2017) hanno chiaramente evidenziato che la presenza dell'infezione nelle aziende è la situazione più frequente (con circa il 97% di allevamenti sieropositivi e il 31% in cui è stata rilevata la presenza dell'RNA virale). Il fatto che gli animali all'ingrasso siano indenni dall'infezione potrebbe rappresentare un vantaggio competitivo per l'azienda. Lo stato di HEV-free potrebbe aprire nuove prospettive di commercializzazione sia per gli animali vivi che per i prodotti derivati da questi animali, ponendo l'allevamento in una posizione vantaggiosa rispetto ad altri per quanto riguarda soprattutto l'esportazione.

Ad oggi, non è ancora stata stabilita una regolamentazione relativa alle misure di profilassi/controllo da adottare nelle aziende infette da HEV e non è presente nemmeno un sistema di qualifica sanitaria che privilegi gli allevamenti indenni. Non è da escludersi che in futuro attestazioni sanitarie relative all'indennità da HEV verranno richieste da alcuni Paesi europei o extraeuropei. Considerando che i controlli sanitari effettuabili sugli animali al macello sono poco efficaci in termini di riduzione del rischio per il consumatore, la strategia migliore è quella di creare filiere e linee produttive separate solamente per gli animali provenienti da allevamenti indenni dall'infezione. Questa manovra permetterebbe di avere prodotti sicuri per il consumatore finale, soprattutto se a base di fegato e se destinati ad essere consumati crudi.

## BIBLIOGRAFIA

1. Aspinall E.J., Couturier E., Faber M., Said B., Ijaz S., Tavoschi L., Takkinen J., Adlhoch C., on behalf of the country experts (2017). Hepatitis E virus infection in Europe: surveillance and descriptive epidemiology of confirmed cases, 2005 to 2015. *Euro surveillance*, 22(26):pii=30561.
2. Caruso, C., Peletto, S., Rosamilia, A., Modesto, P., Chiavacci, L., Sona, B., Balsamelli, F., Ghisetti, V., Acutis, P. L., Pezzoni, G., Brocchi, E., Vitale, N., & Masoero, L. (2017). Hepatitis E virus: A cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high-density pig farming area. *Transboundary and emerging diseases*, 64(5), 1443-1453.
3. Casas M., Pujols J., Rosell R., de Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martin, M. (2009). Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Veterinary microbiology*, 135, 248-252.
4. Di Bartolo, I., Martelli, F., Inglese, N., Pourshaban, M., Caprioli, A., Ostanello, F., & Ruggeri, F. M. (2008). Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Veterinary microbiology*, 132(1-2), 47-55.
5. EFSA Panel on Biological Hazards: Ricci A., Allende A., Bolton D., Chemaly M., Davies



- R., Fernandez-Escamez P.S., Herman L., Koutsoumanis K., Lindqvist R., Nørrung B., Robertson L., Ru G., Sanaa M., Simmons M., Skandamis P., Snary E., Speybroeck N., Ter Kuile B., Threlfall J., Wahlström H., Di Bartolo I., Johne R., Pavio N., Rutjes S., van der Poel W., Vasickova P., Hempen M., Messens W., Rizzi V., Latronico F., Girones R. (2017). Scientific Opinion on the public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen. *EFSA Journal*, 15, 4886, 89 pp.
6. Kamar N., Izopet J., Pavio N., Aggarwal R., Labrique A., Wedemeyer H., Dalton H.R. (2017). Hepatitis E virus infection. *Nature reviews. Disease primers*, 3, 17086.
7. Lange H., Overbo J., Borgen K., Dudman S., Hoddevik G., Urdahl A.M., Vold L., Sjurseth S.K. (2017). Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine. *Epidemiology and infection*, 145, 181-186.
8. Li H., Wu J., Sheng Y., Lu Q., Liu B., Chen Y., Sun Y., Zhou E., Zhao Q. (2019). Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in various pig farms from Shaanxi Province, China: First detection of HEV RNA in pig semen. *Transboundary and emerging diseases*, 66, 72-82.
9. Monne, I., Ceglie, L., Di Martino, G., Natale, A., Zamprogna, S., Morreale, A., Rampazzo, E., Cattoli, G., & Bonfanti, L. (2015). Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiology & Infection*, 143(3), 529-533.
10. Pavio N., Doceul V., Bagdassarian E., Johne R. (2017). Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Veterinary research*, 48, 78.
11. Purcell R.H., Emerson S.U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *Journal of hepatology*, 48, 494-503.
12. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., Smith D.B., ICTV Report Consortium (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *The Journal of general virology*, 98, 2645-2646.
13. Rose N., Lunazzi A., Dorenlor V., Merbah T., Eono F., Eloit M., Madec F., Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 34, 419-427.
14. Salines M., Andraud M., Rose N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Veterinary research*, 48, 31.
15. Thrusfield M.V. (2018). *Veterinary epidemiology*, 4th ed., Wiley-Blackwell.





**PREMIO  
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2021  
VINCITORE**



# UTILIZZO DELL'INTELLIGENZA ARTIFICIALE PER LO SCORE DELLE PLEURITI DEL SUINO

## SCORING PLEURISY IN PIGS THROUGH ARTIFICIAL INTELLIGENCE

TRACHTMAN A.R.<sup>1</sup>, BERGAMINI L.<sup>2</sup>, PALAZZI A.<sup>2</sup>, PORRELLO A.<sup>2</sup>,  
CAPOBIANCO DONDONA A.<sup>3</sup>, DEL NEGRO E.<sup>2,3</sup>, PAOLINI A.<sup>1</sup>, VIGNOLA G.<sup>1</sup>,  
CALDERARA S.<sup>2</sup>, MARRUCHELLA G.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Università Degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria,  
Loc. Piano d'Accio, 64100, Teramo, Italia;*

<sup>2</sup>*AIImageLab, Università Degli Studi di Modena e Reggio Emilia, Via Vivarelli 10/1,  
41125, Modena, Italia;*

<sup>3</sup>*Farm4Trade s.r.l., Via Marino Turchi, 66100, Chieti, Italia.*

**Parole chiave:** pleurite, score, intelligenza artificiale

**Key words:** pleurisy, score, artificial intelligence

### RIASSUNTO

Il macello è ritenuto un utile punto di osservazione per monitorare lo stato sanitario degli animali da reddito, con particolare riferimento alla patologia respiratoria. Nel corso degli anni, sono stati sviluppati numerosi sistemi di *score* delle lesioni nei suini macellati. Sebbene in grado di fornire utili informazioni, tali sistemi risultano comunque piuttosto onerosi e realisticamente incompatibili con la raccolta sistematica dei dati. Il presente studio si è posto l'obiettivo di sviluppare un sistema di identificazione e punteggiatura delle lesioni pleuriche del suino, attraverso l'utilizzo delle reti neurali artificiali ("intelligenza artificiale"). I dati ottenuti evidenziano che le reti neurali, opportunamente addestrate, sono capaci di distinguere efficacemente le mezzene sane da quelle patologiche e di identificare con ottima accuratezza le lesioni pleuriche di maggiore entità. Ciò stimola ulteriori studi, finalizzati all'impiego delle stesse reti neurali per il monitoraggio completo e sistematico delle lesioni al macello.

### ABSTRACT

Respiratory diseases negatively impact the profitability of pig farming. In this respect, the slaughterhouse represents a useful check point for monitoring such diseases. Current slaughterhouse monitoring systems, while able to provide useful data, are not suitable for the systematic examination of slaughtered pigs. The present study aimed to develop a scoring system capable of automatically monitoring pleurisy in slaughtered pigs through the use of artificial intelligence-based technology. Overall, the proposed system proved well able to differentiate healthy from diseased half carcasses, with an overall accuracy of 88.5%. The system was better able to recognize severely affected half carcasses as compared with those showing less severe lesions. Artificial intelligence technology is playing an ever increasing role in the biomedical fields, due to its ability to systematically analyze large quantities of data. The present study shows that such technology could be really useful to systematically monitor diseases in slaughtered animals, encouraging further efforts to develop similar technologies for other disease conditions.

## INTRODUZIONE

Nel corso degli anni, sono stati sviluppati numerosi sistemi di *score* delle lesioni osservate nei suini in sede di macellazione. In tale contesto, una particolare attenzione è da sempre stata rivolta alle patologie respiratorie, dato il loro notevole impatto sulla redditività aziendale (Garcia-Morante *et al.* 2016; Merialdi *et al.* 2012). In linea di principio, il metodo ideale di *score* deve essere semplice, di rapida esecuzione, facilmente standardizzabile ed in grado di fornire dati utili per le valutazioni statistiche del caso. I metodi di *score* delle pleuriti e delle polmoniti del suino rispondono piuttosto bene a questi requisiti generali (Luppi & Merialdi, 2013). Ciononostante, la punteggiatura delle lesioni costituisce un'attività piuttosto onerosa ed impegnativa, il che ne rende di fatto impossibile la realizzazione sistematica.

Al riguardo, le tecnologie basate sull'utilizzo dell'intelligenza artificiale (IA) sembrano offrire interessanti prospettive di sviluppo. L'IA è una disciplina che ha l'obiettivo di sviluppare "agenti intelligenti", vale a dire macchine in grado di percepire/analizzare il contesto nel quale si trovano e di mettere in atto azioni idonee in riferimento ad obiettivi ben definiti (Poole *et al.*, 1998). Lo sviluppo di macchine intelligenti può essere ottenuto seguendo vari approcci. Tuttavia, il cosiddetto "apprendimento statistico" ("*deep learning*", DL) rappresenta attualmente l'approccio migliore, soprattutto nell'ambito del riconoscimento visivo degli oggetti (Krizhevsky *et al.* 2012). Il DL si basa sulla costituzione di reti di processori, interconnessi fra di loro (cosiddette "reti neurali artificiali") ed in grado di "apprendere e ragionare", basandosi sia su dati esterni sia su informazioni interne (Ramesh *et al.* 2014).

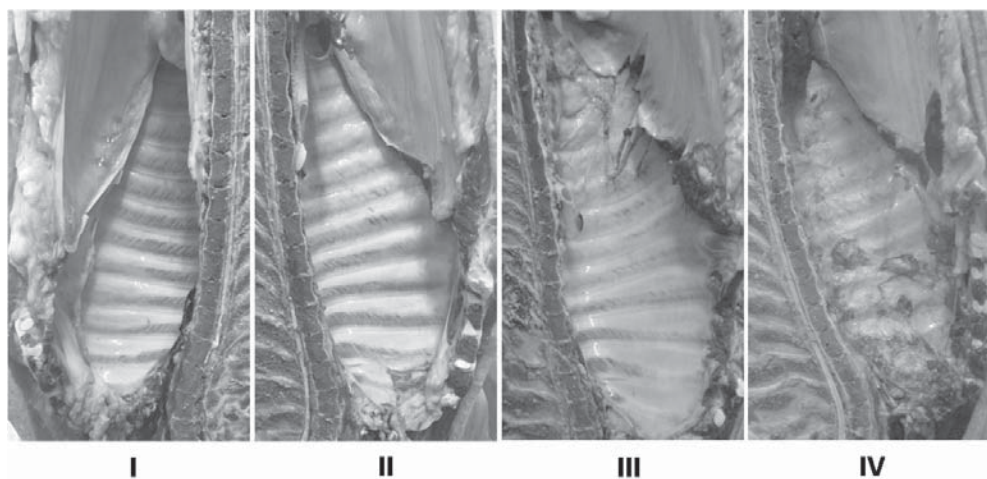
L'obiettivo dello studio è stato quello di addestrare delle reti neurali artificiali per eseguire lo *score* delle pleuriti del suino. L'addestramento delle reti consentirebbe l'automatizzazione del processo, con evidenti vantaggi per una migliore gestione dell'allevamento, dello stato sanitario degli animali e della redditività aziendale.

## MATERIALI E METODI

In totale, sono state esaminate 5902 mezzene, provenienti da suini pesanti macellati in Italia nel periodo 2017-2019. La superficie interna del tronco è stata fotografata utilizzando degli *smartphones*, dopo la rimozione dei visceri e la docciatura delle mezzene. Tutte le immagini sono state esaminate da due veterinari ed alle pleuriti è stato assegnato un punteggio utilizzando una versione semplificata del metodo PEPP (Di Provido *et al.*, 2019), ovvero:

- assenza di pleurite = 0 punti ("classe I");
- pleurite a carico della porzione craniale del costato (primi 5 spazi intercostali) = 1 punto ("classe II");
- pleurite a carico della porzione caudale del costato (dal 6° all'ultimo spazio intercostale) = 2 punti ("classe III");
- pleurite a carico di entrambe le porzioni del costato = 3 punti ("classe IV").

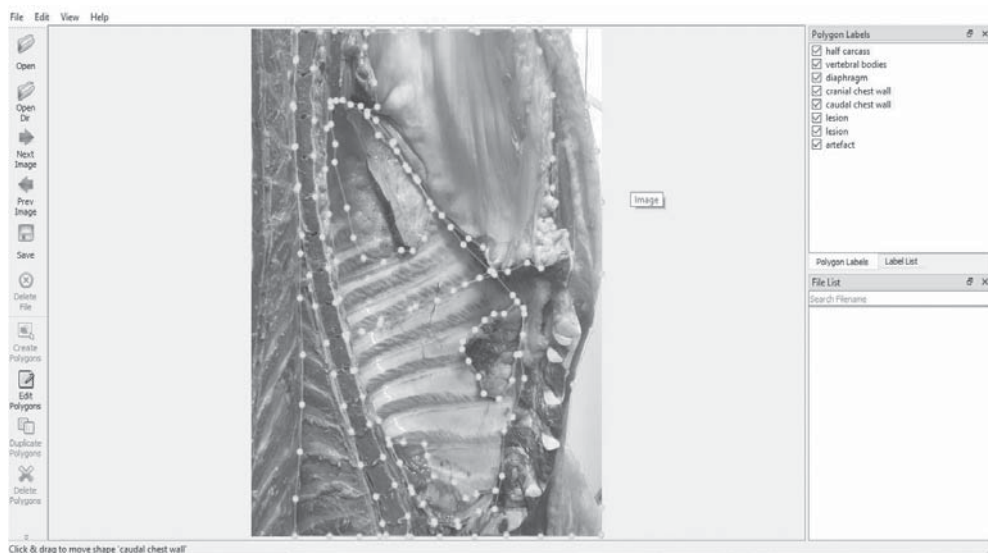
In Figura 1 sono riportati alcuni esempi di quanto sopra esplicitato. Tutti i punteggi assegnati sono stati condivisi dai due operatori e registrati su un foglio di calcolo.



**Figura 1. Superficie interna della parete toracica.** Si riportano alcuni esempi, rappresentativi di ciascuna classe di punteggio: (I) pleura parietale con aspetto normale, in assenza di lesioni rilevabili macroscopicamente (punteggio 0); (II) lesione pleurica in corrispondenza della porzione più craniale della parete toracica, a carico dei primi due spazi intercostali (punteggio 1); (III) pleurite cronica fibro-adesiva che interessa la porzione più caudale della parete toracica, in prossimità del diaframma (punteggio 2); (IV) l'intera pleura parietale è affetta da un processo infiammatorio cronico (punteggio 3).

**Figure 1. Internal surface of the chest wall.** Explanatory examples representing each of the four classes are shown: (I) the parietal pleura appears healthy, with no gross lesions (0 points); (II) pleurisy affects the cranial portion of the chest wall, in particular the first two intercostal spaces (1 point); (III) chronic fibro-adhesive pleurisy affects the caudal portion of the chest wall, adjacent to the diaphragm (2 points); (IV) the entire inner chest wall surface is affected with a chronic inflammatory process (3 points).

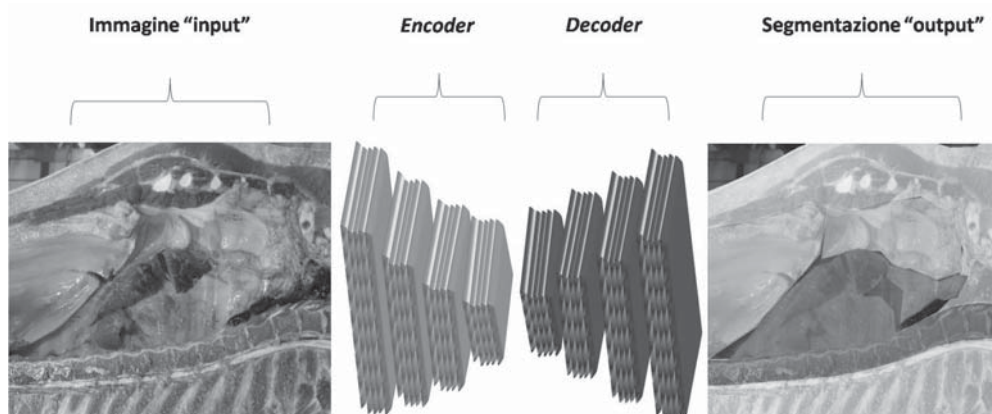
Successivamente, gli stessi veterinari hanno provveduto all'annotazione di tutte le immagini ("segmentazione"), utilizzando un apposito strumento (<http://labelme.csail.mit.edu>). In particolare, sono stati annotati i seguenti distretti: profilo della mezzena, colonna vertebrale, diaframma, porzione craniale e caudale del costato, artefatti (presenza di sangue, incisioni occorse durante le operazioni di macellazione, porzioni di organi sovrapposte al costato) e lesioni pleuriche (Figura 2).



**Figura 2. Annotazione di un'immagine.** L'immagine mostra la schermata tipo che si ottiene annotando l'immagine con il *software* "labelme". In alto a destra è riportata la lista dei campi potenzialmente annotabili su ciascuna immagine.

**Figure 2. Image annotation.** The figure shows an image annotated using the "labelme" software. A list of annotation labels is shown at the top right corner of the figure.

Una parte preponderante delle immagini così annotate ("*training set*";  $n = 5702$ ) è stata somministrata alla rete neurale artificiale da addestrare (Figura 3). Quest'ultima deriva dalla rete "U-Net", particolarmente adatta alla segmentazione rapida e precisa di immagini digitali (Ronneberger *et al.* 2015).



**Figura 3. Rappresentazione grafica del funzionamento della rete neurale.** La rete si compone di due strutture, che elaborano l'immagine somministrata ("*input*") in sequenza: *encoder* e *decoder*. L'*encoder* traduce l'immagine in un "vettore", mentre il *decoder* converte il vettore in "strati segmentati" ("*output*"), che potranno essere confrontati con le annotazioni manuali degli operatori.



**Figure 3. Schematic representation of the neural network.** The network is composed of two structures, an “encoder” and a “decoder” which elaborate the input image. The encoder translates the image into a “compressed features vector”. The decoder converts the vector into an output composed of “segmentation layers”, which can be compared with the manual annotations provided by the veterinarians.

Le altre 200 immagini (“*test set*”; 50 per ciascuna classe di punteggio) sono state, invece, fornite alla rete soltanto alla fine, per apprezzarne le *performances*. A tale scopo, è stato utilizzato un “classificatore”, in grado di convertire quanto elaborato dalla rete neurale artificiale in un punteggio numerico. In particolare, il classificatore ha analizzato tre “strati” di segmentazione (costato craniale, costo caudale, lesioni pleuriche), attribuendo i seguenti punteggi:

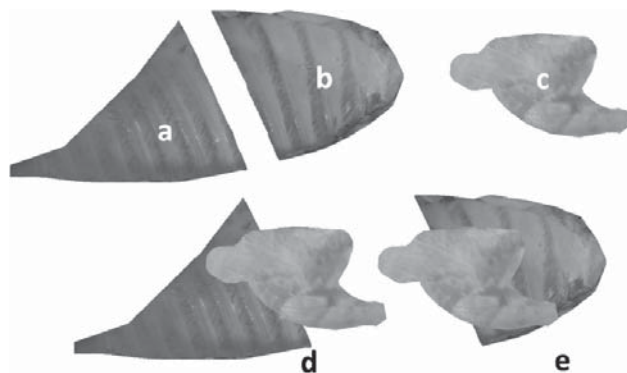
- lesione pleurica sovrapposta alla porzione craniale del costato = 1 punto;
- lesione pleurica sovrapposta alla porzione caudale del costato = 2 punti;
- lesioni pleuriche sovrapposte ad entrambe le aree del costato = 3 punti.

La Figura 4 riporta un esempio di punteggiatura delle lesioni da parte del classificatore. Le *performances* (accuratezza, sensibilità e specificità) della rete neurale addestrata sono state confrontate con gli *scores* forniti dai veterinari e che hanno rappresentato il *gold standard* di riferimento. Inoltre, le prestazioni della rete neurale addestrata sono state confrontate con quelle di una identica rete (“base”) alla quale erano state somministrate esclusivamente le immagini e gli *scores* corrispondenti, senza alcuna annotazione.

## RISULTATI

Le osservazioni effettuate dai due veterinari hanno evidenziato la presenza di pleurite nel 42.07% delle immagini analizzate (2483/5902), con punteggio 1 in 516 casi (8.74%), punteggio 2 in 656 mezzene (11.11%) e punteggio 3 in 1311 immagini (22.21%).

Come riportato in Tabella 1, l’accuratezza complessiva della rete neurale addestrata, valutata sul *test set* (200 immagini) è risultata pari all’85.5%. La rete neurale addestrata si è dimostrata in grado di riconoscere efficacemente le mezzene “sane” (classe I; accuratezza = 96%) e quelle affette da pleurite (classe II+III+IV; accuratezza = 98%). In particolare, la rete ha mostrato valori di accuratezza molto elevati per le lesioni di classe IV (accuratezza = 92%) e di classe III (accuratezza = 84%), mentre ha interpretato con minore accuratezza le lesioni di classe II (accuratezza = 70%). L’addestramento *ad hoc* della rete neurale, attraverso la somministrazione di immagini annotate, ha fornito risultati nettamente migliori in termini di accuratezza, sensibilità e specificità (Tabelle 1 e 2).



**Figura 4. Assegnazione del punteggio tramite un classificatore.** A tal fine, vengono presi in considerazione i seguenti tre “strati segmentati”: la porzione caudale della parete toracica

(a); la porzione craniale della parete toracica (b); le lesioni eventualmente presenti (c). Il punteggio scaturisce dalla sovrapposizione o meno della/e lesione/i con ciascuna delle porzioni della parete toracica. Nel caso specifico, la lesione si sovrappone ad entrambe le porzioni del costato (d, e), con conseguente attribuzione del punteggio 3.

**Figure 4. Scoring lesions using a classifier.** Three “segmentation layers” are considered to assign a score to each image: the caudal chest wall area (a); the cranial chest wall area (b); lesion/s (c). The final score results from the overlapping between the lesion/s and the two parts of the chest wall. In the case shown herein, a large lesion partially overlaps with both chest wall areas (d, e), thus providing an overall score of 3.

| Metodo                                                                  | Accuratezza (%) |           |            |           |                   |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|------------|-----------|-------------------|
|                                                                         | Classe I        | Classe II | Classe III | Classe IV | Accuratezza media |
| Rete neurale artificiale “base”                                         | 92              | 70        | 62         | 68        | 73                |
| Rete neurale artificiale addestrata <i>ad hoc</i> con immagini annotate | 96              | 70        | 84         | 92        | 85,5              |

**Tabella 1: accuratezza delle reti neurali.** I dati indicano chiaramente che la rete neurale addestrata utilizzando le immagini annotate dai veterinari raggiunge valori di accuratezza molto elevati, superiori rispetto a quelli ottenuti dalla stessa rete alimentata con immagini non annotate (“base”).

**Table 1: accuracy of the neural networks.** Data is shown regarding the accuracy rates of both baseline and ad hoc trained methods. Accuracy values clearly indicate that the segmentation-based approach provides better results.

| Classe    | Rete neurale artificiale “base” | Rete neurale artificiale addestrata <i>ad hoc</i> con immagini annotate |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
|           | Specificità (%)                 |                                                                         |
| I         | 92                              | 96                                                                      |
|           | Sensibilità (%)                 |                                                                         |
| II        | 84                              | 78                                                                      |
| III       | 86                              | 98                                                                      |
| IV        | 96                              | 100                                                                     |
| II+III+IV | 88.6                            | 92                                                                      |

**Tabella 2: sensibilità e specificità delle reti neurali.** La specificità risulta molto elevata con entrambi i metodi. La rete neurale addestrata *ad hoc* mostra valori di sensibilità molto elevati per le classi III e IV; la sensibilità è inferiore per la classe II, verosimilmente a causa di lesioni molto piccole, non rilevate dalla macchina. Anche in questo caso, le prestazioni della rete addestrata risultano migliori rispetto alla rete neurale “base”, con la sola eccezione della classe II.

**Table 2: sensitivity and specificity of the neural networks.** Very high specificity rates were obtained for both methods. The ad hoc trained method obtained very high sensitivity rates for classes III and IV; the lower sensitivity rate obtained for class II was likely caused by the presence of very small lesions, which remained overlooked by the artificial neural network. Also in this case, better results were obtained by the ad hoc trained method as compared with the “baseline” one, with the only exception of class II.

## DISCUSSIONE

È ragionevole ritenere che le tecnologie basate sull'IA rivoluzioneranno molte delle attività umane nei prossimi anni a venire. A tal proposito, il loro impiego in campo biomedico è particolarmente promettente (Anonimo, 2019). Basti pensare che oltre 27.000 pubblicazioni scientifiche sono ad oggi disponibili su “*US National Library of Medicine National Institutes of Health*” inserendo le parole chiave “*artificial intelligence*” e “*medicine*”. Ciononostante, sono davvero pochissimi i tentativi di applicazione dell'IA in patologia veterinaria (Awaysheh *et al.*, 2018; Hattel *et al.*, 2013; McKenna *et al.*, 2020; Sanchez-Vazquez *et al.*, 2012).

Per quanto a nostra conoscenza, questo studio rappresenta il primo tentativo di utilizzo dell'IA per il rilievo e la punteggiatura delle lesioni in sede di macellazione. Nel complesso, i nostri dati indicano che le reti neurali, se opportunamente addestrate, sono in grado di distinguere tessuti sani da quelli patologici. In particolare, i risultati ottenuti dalle reti neurali sono pressoché sovrapponibili con il *gold standard* (vale a dire la punteggiatura eseguita dai veterinari) per le mezzene sane o affette da lesioni particolarmente estese. La minore accuratezza delle reti neurali per i punteggi intermedi (classe II e III) potrebbe dipendere da diversi fattori:

- a) il numero di mezzene con punteggio 1 e 2, inserite nel “*training set*”, era decisamente inferiore rispetto a quelle con punteggio 0 e 3. Questo limite potrebbe essere risolto aumentando le dimensioni del “*training set*”, considerando che le reti neurali possono essere continuamente alimentate per migliorare le loro prestazioni;
- b) la presenza di pleuriti di piccole dimensioni a cavallo del 5° spazio intercostale, di non facile interpretazione anche per i veterinari. In questo caso, riteniamo che l’“errore” compiuto dalle reti neurali artificiali potrebbe rivelarsi, paradossalmente, un valore aggiunto, grazie ad una lettura più standardizzata e meno soggettiva delle lesioni.

L’addestramento delle reti neurali per l’identificazione e lo *score* di altre condizioni patologiche e la realizzazione di test su vasta scala in impianti di macellazione ad elevata capacità costituiranno il naturale proseguimento di questo studio. Quanto al primo punto, è attualmente in corso l’addestramento di reti neurali artificiali per identificare e quantificare lesioni riferibili a polmonite enzootica del suino. In questo caso, l’acquisizione e l’analisi delle immagini risulta più complessa. Tuttavia, i dati preliminari indicano che la macchina è in grado di riconoscere con elevata accuratezza la *silhouette* del polmone e l’eventuale presenza di lesioni infiammatorie (>90%), mentre le prestazioni in merito alla quantificazione delle polmoniti sono ancora insoddisfacenti (accuratezza compresa fra il 30 e l’80%) e rendono indispensabile aumentare notevolmente il *training set*.

## CONCLUSIONI

In conclusione, riteniamo che le tecnologie basate sull'IA potranno essere di grande aiuto per il rilievo sistematico, in tempo reale ed a basso costo delle lesioni – e non solo – anche in sede di macellazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Anonimo (2019) “Future in the balance? How countries are pursuing an AI advantage. Insights from Deloitte’s State of AI in the Enterprise” (disponibile all’indirizzo web <https://www2.deloitte.com/us/en/insights/focus/cognitive-technologies/ai-investment-by-country.html>).
2. Awaysheh A., Wilcke J., Elvinger F., Rees L., Fan W., Zimmerman K. (2018) “Identifying free-text features to improve automated classification of structured histopathology reports for feline small intestinal disease”. *J Vet Diagn Invest.* 30, 211-217.

3. Di Provvido A., Trachtman A.R., Farina E., Odintzov Vaintrub M., Fragassi G., Vignola G., Marruchella G. (2019) "Pleurisy evaluation on the parietal pleura: an alternative scoring method in slaughtered pigs". *J Swine Health Prod.* 27, 312-316.
4. Garcia-Morante B., Segalés J., Fraile L., Pérez de Rozas A., Maiti H., Coll T., Sibila M. (2016) "Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced pneumonia using different lung lesion scoring systems: a comparative review". *J Comp Pathol.* 154, 125-134.
5. Hattel A., Monga V., Srinivas U., Gillespie J., Brooks J., Fisher J., Jayarao B. (2013) "Development and evaluation of an automated histology classification system for veterinary pathology". *J Vet Diagn Invest.* 25, 765-769.
6. Krizhevsky A., Sutskever I., Hinton G.E. (2012) "ImageNet classification with deep convolutional neural networks" in: Bartlett P., Pereira F., Burges C.J., Bottou L., Weinberger K.Q. "Advances in neural information processing systems". Red Hook Curran Associates Inc., 1097-1105.
7. Luppi A., Merialdi G. (2013) "Lesioni al macello" in: Martelli P. "Le Patologie del Maiale", Milan, Le Point Veterinaire Italie, 199-217.
8. McKenna S., Amaral T., Kyriazakis I. (2020) "Automated Classification for Visual-Only Postmortem Inspection of Porcine Pathology". *IEEE Trans Autom Sci Eng.* 17(2), 1005.
9. Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., Luppi A., Gozio S., Pozzi P., Spaggiari B., Martelli P. (2012) "Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors". *Vet J.* 193, 234–239.
10. Poole D., Alan M., Randy G. (1998) "Computational intelligence: a logical approach". Oxford University Press, Inc.
11. Ramesh A.N., Kambhampati C., Monson J.R.T., Drew P.J. (2004) "Artificial intelligence in medicine". *Ann R Coll Surg Engl.* 86, 334–338.
12. Ronneberger O., Fischer P., Brox T. (2015) "U-Net: Convolutional Networks for Biomedical Image Segmentation" in: Navab N., Hornegger J., Wells W.M., Frangi A.F. "Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention". Springer, 234-241.
13. Sanchez-Vazquez M.J., Nielen M., Edwards S.A., Gunn G.J., Lewis F. (2012) "Identifying associations between pig pathologies using a multi-dimensional machine learning methodology". *Vet Res.* 8, 151.

**PREMIO  
CASIMIRO TAROCCO 2021  
VINCITORE**



# **NUOVO INDICE DI VALUTAZIONE DELLE PARTITE SUINE CONFERITE PRESSO IL MACELLO SULLA BASE DEI PARAMETRI QUALITATIVI DELLE COSCE FRESCHE RIFILATE**

## **NEW INDEX OF EVALUATION OF THE PIG BATCHES DELIVERED TO THE SLAUGHTERHOUSE ON THE BASIS OF THE QUALITATIVE PARAMETERS OF THE FRESH TRIMMED HAMS**

VISCIDO P. A.

*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*

**Parole chiave:** Macello suino, Prosciutti DOP, Difetti dei prosciutti

**Keywords:** *Pig slaughterhouse, PDO hams, Ham flaws*

### **RIASSUNTO**

L'industria di macellazione suina, vista l'importanza e la mole di capi macellati, necessita sempre più di un'implementazione dei nuovi sistemi che possano monitorare in modo continuativo la qualità delle partite di suini dall'allevamento al prosciuttificio. In particolare diventa fondamentale analizzare quei parametri che maggiormente vanno ad incidere sulla qualità della partita. Col presente studio è stato applicato un indice di valutazione delle partite suine sulla base di quattro parametri qualitativi, relativi alle cosce fresche rifilate, corrispondenti a: % di uniformità del peso delle carcasse, % di difettosità presenti sui prosciutti freschi, giudizio degli operatori esperti al reparto rifilo e infine % di prosciutti classificati come prima scelta. La valutazione giornaliera di questi parametri ha permesso di generare un voto finale corrispondente al valore qualitativo delle partite suine con conseguente classificazione dei fornitori migliori e fornitori peggiori nel periodo estivo ed invernale. Da tale indice è stata poi analizzata la % di difetti traumatici presenti sulle cosce suine dei fornitori migliori e peggiori nel medesimo periodo; qui si è riscontrata una percentuale di difetti più marcata nel periodo estivo rispetto a quello invernale. Inoltre, la sosta notturna dei suini presso l'azienda di macellazione è stata confermata come probabile fattore predisponente per una maggiore prevalenza di difetti di origine traumatica sulle cosce fresche rifilate.

### **ABSTRACT**

Considering the importance and the huge number of slaughtered animals, the pork butchery industry increasingly needs an implementation of new systems that could continuously monitor pig batches' quality from the breeding farm to the ham factory. In particular, it is essential analyzing the parameters that mostly affect the quality of the batch. The study hereby applies an evaluation index of pig batches which considers four qualitative parameters relative to fresh trimmed thighs, which are: percentage of the carcass weight uniformity, percentage of fresh ham flaws, evaluation of trimming department experts and, finally, the percentage of hams classified as first choice. The daily assessment of the mentioned parameters has produced a final grade that corresponds to the qualitative value of the pig batches and, consequently, the classification of the best and worst suppliers in summer and winter periods. From that index, the percentage of pork legs' traumatic flaws of the best and worst suppliers over the same period has then been analyzed. It has therefore been detected a higher percentage of flaws in the summer production than in the winter period. Furthermore, the pigs' overnight stop at the slaughterhouse has been confirmed to be the probable factor for a greater prevalence of traumatic flaws on fresh trimmed thighs.



## INTRODUZIONE

Il macello rappresenta l'anello della filiera produttiva dei prosciutti (crudi DOP, crudi o cotti) a cui spetta la valutazione delle caratteristiche e conseguente conformità delle cosce fresche rifilate destinate alle aziende di trasformazione. I trattamenti pre-macellazione influenzano fortemente la qualità della carne e le caratteristiche delle cosce fresche (Rosenvold et al., 2003). In Italia i difetti di origine traumatica legati allo stress dei trattamenti pre-macellazione hanno una frequenza complessivamente elevata, a conferma del fatto che il numero di prosciutti respinti dalla produzione di prosciutto crudo DOP rappresenta un problema economico rilevante per l'industria suina italiana (Bottacini et al., 2018) considerando che una mancanza di qualità determina una perdita economica sul singolo taglio rifilato. Lo scopo del presente studio è quello di applicare un indice di valutazione sulle partite suine, in ingresso presso il macello, sulla base di quattro parametri qualitativi relativi alle cosce fresche rifilate che possono essere raccolti e utilizzati per adottare misure preventive e migliorative a partire dall'allevamento allo stordimento in macello.

## MATERIALI E METODI

La fase sperimentale del seguente elaborato di tesi è stato svolto presso OPAS, ovvero una cooperativa di allevatori che ha sede produttiva a Carpi (MO) in modo tale da effettuare un monitoraggio continuo sulla qualità del prodotto acquistato e venduto attraverso un efficiente sistema informatico di cui è provvista l'azienda.

### Raccolta dati

La raccolta dati è stata effettuata per due mesi invernali, dal 18 Ottobre al 18 Dicembre 2019, e due mesi estivi, dal 1 Luglio fino al 1 Settembre 2019; il monitoraggio dei dati è avvenuto giornalmente su tutti i lotti macellati dal Lunedì al Venerdì per un totale di 87 giorni di raccolta e analisi dei dati e quindi valutazione di ogni singola partita in entrata. Il lavoro prevedeva, sulle singole partite programmate nel piano di macellazione, una fase iniziale di raccolta giornaliera dei dati riguardanti quattro parametri che corrispondevano a: giudizio soggettivo degli operatori al reparto rifilo, % di difettosità delle cosce rifilate, % di prima scelta e % di uniformità della partita. Come si evince dalla **tabella 1**, per ogni singolo parametro, assegnato per partita, è stata conferita una votazione in base al range percentuale raggiunto e in base al giudizio dei valutatori al reparto rifilo.

| VALUTAZIONE DELLA PARTITA (media dei 4 valori) |                  |        |        |        |          |       |
|------------------------------------------------|------------------|--------|--------|--------|----------|-------|
| Parametri di valutazione                       | tipo di giudizio |        |        |        |          |       |
| Votazione                                      | 3                | 4      | 5      | 6      | 7        | 8     |
| Media giudizio dei 2 valutatori (dx/sx)        | Ins              |        | Suff   | Disc   | Ok       |       |
| % prosciutti di prima scelta                   | < 25             | 25-35% | 35-45% | 45-55% | 55 - 75% | > 75% |
| % difetti                                      | > 25%            | 20-25% | 14-20% | 10-14% | 10-8%    | < 8%  |
| % uniformità                                   | < 20%            | 20-30% | 30-40% | 40-50% | 50-60%   | > 60% |
| % carne magra                                  | >54%             |        | 53-54% | 52-51% | 50%-51%  |       |

**Tabella 1.** Voto dei quattro parametri costituenti l'indice di valutazione delle partite suine.  
**Table 1.** Rating of the four parameters making up the evaluation index of swine lots.

| Allevatore/Fornitore   | Giudizio | Voto Giudizio | % difetti | Voto Difetti | % prima | Voto Prima | % uniformità | Voto Uniformità | Media Ponderata | Media aritmetica | Genetica             |
|------------------------|----------|---------------|-----------|--------------|---------|------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|----------------------|
| Allevatore/Fornitore C | Ins      | 5             | 25,39     | 3            | 52      | 6          | 39,4         | 5               | 4,50            | 4,75             | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Suff     | 6             | 36,9      | 3            | 29,8    | 4          | 49,6         | 6               | 4,90            | 4,75             | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Suff     | 6             | 24,6      | 4            | 69      | 7          | 46,5         | 6               | 5,50            | 5,75             | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Ins      | 5             | 26,58     | 3            | 55,6    | 7          | 57,5         | 7               | 5,20            | 5,5              | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Ins      | 5             | 25,79     | 3            | 51,2    | 6          | 56,7         | 7               | 5,10            | 5,25             | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Ins      | 5             | 30,55     | 3            | 40,5    | 5          | 54,8         | 7               | 5,00            | 5                | Pic 337              |
| Allevatore/Fornitore C | Ins      | 5             | 29,76     | 3            | 48,4    | 6          | 61,4         | 8               | 5,40            | 5,5              | Gorzagri<br>Gorzagri |
| Allevatore/Fornitore C | Suff     | 6             | 22,4      | 4            | 9,2     | 3          | 40,5         | 6               | 5,10            | 4,75             | Gorzagri<br>Gorzagri |

**Tabella 2.** Esempio di valutazione di un dato fornitore.

**Table 2.** Example of a supplier evaluation.

Come si evince dalla **Tabella 2** è stata calcolata inizialmente una media aritmetica dei quattro parametri e successivamente è stata calcolata una media ponderata che prendesse meno in considerazione la % di prosciutti di prima scelta che pesa per un 10% sulla media ponderata finale. Quest'ultimo parametro è, infatti, fortemente influenzato da fattori commerciali.

### Uniformità

L'uniformità del peso delle carcasse suine è da intendersi sia per peso di carcassa, che per peso, resa e caratteristiche morfologiche dei singoli tagli, in questo caso riferiti alle singole cosce fresche rifilate. Nel macello OPAS la determinazione del peso delle carcasse, e dell'uniformità delle partite, avviene attraverso una bilancia che è posta sulla linea di macellazione e, attraverso un software aziendale, avviene il trasferimento delle informazioni all'immagine meat che, attraverso delle equazioni di stima, consente una corretta classificazione delle carcasse e conseguenzialmente delle cosce destinate al circuito DOP. L'uniformità viene misurata sul peso morto freddo e il range di peso morto freddo considerato ottimale (incluso nell'uniformità) è dai 130 ai 150 kg circa. Considerando che il valore relativo alla resa di macellazione della specie suina corrisponde a  $1'82\% \pm 4\%$  (CSQA, 2019), se una partita suina è caratterizzata da un'uniformità pari al 50%, ciò indica che abbiamo il 50% di maiali con dei prosciutti caratterizzati da un range di peso compreso tra i 13,4 e i 15,5 Kg, quindi ottimali per il circuito DOP; come si osserva dalla **tabella 1**, viene assegnata una votazione da 3 a 8 in base alla percentuale raggiunta dalla partita suina.

### Difetti

Il macello OPAS giornalmente, al reparto rifilatura, effettua un monitoraggio dei difetti più eclatanti presenti sulle singole cosce fresche rifilate, fornendo in questo modo una percentuale sulla difettosità giornaliera delle singole partite macellate previste dal piano di macellazione; la % di difettosità delle cosce fresche rifilate comprende difetti di origine traumatica e difetti di origine genetica. I difetti genetici monitorati corrispondono a: carni PSE, magri in corona, magroni (spessore sottonoce), difetto di vena, grassinati. I difetti traumatici comprendono: strappi, ematomi, morsi, cotenne rosse, anchette rotte, microemorragie causate allo stordimento elettrico e infine il difetto di vena (n.b.: i difetti di vena e i difetti PSE hanno sia una base genetica che una base legata alle procedure di macellazione).

Nella **tabella 1** è riportato il punteggio assegnato in base alla percentuale di difetti presenti nei prosciutti freschi. Tali difettosità vengono registrate e calcolate come percentuale per lotto e vengono valutate ed osservate da operatori abilitati al reparto rifilo.

### **Giudizio soggettivo degli operatori al reparto rifilo**

Nel reparto rifilo del macello OPAS avviene quello che viene definito “giudizio soggettivo degli operatori” che si basa sull’ispezione visiva delle singole cosce fresche che avviene successivamente la fase di rifilatura; i due operatori esperti dispongono di un display attraverso il quale avviene l’effettiva valutazione qualitativa e conseguente classificazione dei prosciutti freschi. La prima classificazione avviene attraverso la pesatura con il passaggio delle cosce appena rifilate su delle apposite bilancelle poste precedentemente agli operatori esperti che procederanno a classificare i prosciutti anche in base alla pezzatura desiderata dal cliente e in base ai parametri di peso considerati idonei dai disciplinari di produzione. Gli operatori hanno a disposizione un massimo di 7 secondi per analizzare la qualità del prosciutto fresco osservando l’eventuale presenza di difetti genetici o traumatici, osservando la qualità, la consistenza e il colore del grasso, la qualità dei fasci muscolari che costituiscono la coscia; in seguito selezionano sul display il difetto più eclatante che maggiormente va a penalizzare il prosciutto (in modo da monitorare giornalmente la % di difettosità delle singole partite); infine, lo classificano e viene assegnato un giudizio da insufficiente, sufficiente, discreto oppure ok (valutazione massima e raramente assegnata) in base alla percentuale raggiunta come si evince dalla **tabella 1**.

### **Prima scelta delle cosce rifilate**

Il macello OPAS identifica le cosce suine fresche in prima, “primetta”, seconda (quindi idonei a diventare prosciutti di Parma DOP) e terza scelta o “spolpo” che corrispondono ai prosciutti cosiddetti “smarchiati” non destinati al circuito tutelato e questo si effettua in base a canoni di grandezza, peso, qualità del grasso, della carne e sulla base di difetti presenti sulle cosce fresche. Ovviamente cosce di diversa scelta porteranno a produrre livelli di qualità diversi con una forbice di prezzo sensibilmente diversa. La % di prosciutti di prima scelta è fortemente influenzata da scelte commerciali riguardanti il cliente e le caratteristiche che desiderano in una coscia fresca rifilata; per cui diventa fondamentale per l’azienda di macellazione classificarle anche in base **a ciò che desidera il cliente limitando** quanto più possibile la % di resi. È per questo motivo che la % di prosciutti di prima scelta nella media ponderata finale della valutazione delle partite suine inciderà per un 10% a fronte degli altri tre parametri qualitativi che incideranno per un 30%.

### **Analisi e monitoraggio dei difetti di origine traumatica e della sosta notturna**

Sulla base del nuovo indice di valutazione delle partite suine è stata effettuata un’ulteriore analisi sulle difettosità di origine traumatica presenti sulle cosce fresche rifilate, in modo particolare sono state monitorate le percentuali di strappi, ematomi e morsi in quanto, se presenti in profondità nel muscolo, vanno ad incidere maggiormente sulla qualità finale della coscia fresca determinando danni irreparabili che vanno a declassare il prodotto finale. L’analisi di tali difetti permetterebbe di individuare in modo tempestivo i danni sopracitati per adottare contromisure durante la fase di pre-macellazione. Come riporta la **tabella 3**, sono state monitorate le percentuali di strappi, ematomi e morsi, in seguito è stata effettuata una somma di questi tre difetti per ogni singola partita ed è stata riportata anche la percentuale di difettosità genetiche in modo da poter effettuare un confronto sull’incidenza delle due tipologie di difetti su quelli totali. Inoltre, per ogni singola partita, è stata analizzata l’incidenza della sosta notturna sulla % di strappi, ematomi e

morsi per confermare o meno gli studi secondo cui una breve permanenza in stalla può limitare la presenza di difetti nella carcassa e nella carne (Faucitano, L., et al, 2008). In OPAS i suini vengono macellati il giorno stesso dello scarico o il giorno successivo; nella **tabella 3** sottostante “P” equivale a “posticipo” ovvero la data di scarico non corrisponde alla data di macellazione (partite macellate il giorno dopo), mentre “S” indica “subito” ovvero le partite suine vengono macellate il giorno in cui vengono scaricate presso il macello.

| Allevatore/Fornitore    | Scarico | Autista    | Strappi % | Ematomi % | MordiRif % | Tot.Difetti Movimentazione | Tot. Difetti Genetici | Tot. Difetti % |
|-------------------------|---------|------------|-----------|-----------|------------|----------------------------|-----------------------|----------------|
| Allevamento/Fornitore B | S       | Autista 14 | 0,40 %    | 3,97 %    | 0,40 %     | 4,76 %                     | 13,89 %               | 18,65 %        |
| Allevamento/Fornitore B | P       | Autista 14 | 2,38 %    | 3,17 %    | 0,00 %     | 5,56 %                     | 9,92 %                | 15,48 %        |
| Allevamento/Fornitore B | S       | Autista 14 | 0,82 %    | 2,05 %    | 0,00 %     | 2,87 %                     | 28,28 %               | 31,15 %        |
| Allevamento/Fornitore B | P       | Autista 14 | 0,87 %    | 3,06 %    | 0,87 %     | 4,80 %                     | 18,78 %               | 23,58 %        |
| Allevamento/Fornitore B | P       | Autista 14 | 1,67 %    | 5,83 %    | 1,67 %     | 9,17 %                     | 17,08 %               | 26,25 %        |
| Allevamento/Fornitore B | S       | Autista 14 | 1,25 %    | 3,33 %    | 0,00 %     | 4,58 %                     | 12,50 %               | 17,08 %        |
|                         |         |            | 1,23%     | 3,57%     | 0,49%      | 5,29%                      | 16,74 %               | 22,03%         |

**Tabella 3.** Esempio monitoraggio dei difetti traumatici.

**Table 3.** Example monitoring of traumatic defects.

### Analisi statistica

L'intero campione delle partite monitorate (343 per l'indice di valutazione finale delle partite, 425 per la valutazione dei difetti delle cosce) è stato preventivamente valutato per determinare i valori medi, la deviazione standard, i valori minimi e massimi, la distribuzione di normalità (skeweness e curtosi). È stata considerata una soglia di significatività minima pari a  $P < 0.05$ . tutte le analisi sono state svolte utilizzando il software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2011).

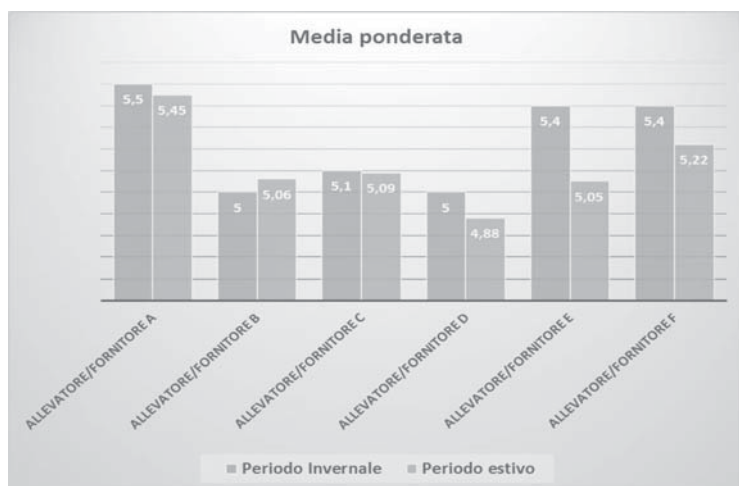
## RISULTATI E DISCUSSIONE

Sulla base dei dati raccolti giornalmente sulle singole partite e data l'elevata mole di dati a disposizione si è ritenuto necessario identificare 12 fornitori che corrispondono a sei fornitori migliori e sei fornitori peggiori. Il nome dei fornitori e i tipi genetici delle partite sono stati criptati per questioni relative alla privacy.

| Periodo estivo 6 fornitori peggiori |          |               |           |              |         |            |              |                 |                 |                  |                     |
|-------------------------------------|----------|---------------|-----------|--------------|---------|------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------------|
| Allevatore/ Fornitore               | Giudizio | Voto Giudizio | % Difetti | Voto difetti | % Prima | Voto prima | % Uniformità | Voto uniformità | Media ponderata | Media Aritmetica | Genetica Prevalente |
| Allevatore/ Fornitore A             | Ins      | 5,16          | 21,51     | 4,16         | 48,58   | 6          | 52,03        | 6,83            | 5,45            | 5,54             | Genetica 4          |
| Allevatore/ Fornitore B             | Ins      | 5,33          | 22,02     | 4,16         | 28,41   | 4,16       | 45,55        | 6               | 5,06            | 4,91             | Genetica 5          |
| Allevatore/ Fornitore C             | Ins      | 5,37          | 27,74     | 3,25         | 44,46   | 5,5        | 50,8         | 6,5             | 5,09            | 5,15             | Genetica 3          |
| Allevatore/ Fornitore D             | Ins/Suff | 5,5           | 19,39     | 4,66         | 28,8    | 3,83       | 27,41        | 4,83            | 4,88            | 4,7              | Genetica 3          |
| Allevatore/ Fornitore E             | Ins/Suff | 5,5           | 22,98     | 4            | 42,87   | 5,2        | 40,55        | 5,6             | 5,05            | 5,07             | Genetica 3/ 5/ 9    |
| Allevatore/ Fornitore F             | Ins/Suff | 5,63          | 14,81     | 5,72         | 38,88   | 5          | 25,16        | 4,36            | 5,22            | 5,18             | Genetica 8          |

**Tabella 4.** Valutazione dei parametri qualitativi relativi ai 6 fornitori peggiori nel periodo estivo.

**Table 4.** Evaluation of the qualitative parameters relating to the 6 worst suppliers in the summer period.



**Grafico 1.** Media ponderata dei 6 fornitori peggiori in inverno e in estate.  
**Graph 1.** Weighted average of the 6 worst suppliers in winter and summer.

Nel **Grafico 1** si osserva l'indice di valutazione finale dei 6 fornitori peggiori e migliori corrispondente alla media ponderata dei quattro parametri presi in esame sulle singole partite nel periodo estivo ed invernale. Si rileva che nessuno dei sei fornitori peggiori raggiunge una valutazione sufficiente. Il fornitore A presenta la valutazione più elevata fra i sei (pari a 5,5 nel periodo invernale e 5,45 nel periodo estivo) dovuta principalmente ad una valutazione positiva dell'uniformità, sia in estate che in inverno; al contrario il fornitore D presenta la valutazione peggiore (pari a 5 nella stagione invernale e 4,88 in quella estiva) a causa di una valutazione particolarmente insufficiente della % di difetti e della % di prosciutti di prima scelta. Inoltre si nota una sostanziale differenza della valutazione finale tra le due stagionalità.

**Analisi statistica (varianza a due vie) degli indici parziali e finali delle partite analizzate in funzione della qualifica del fornitore (migliore vs peggiore) e della stagione (estate vs inverno)**

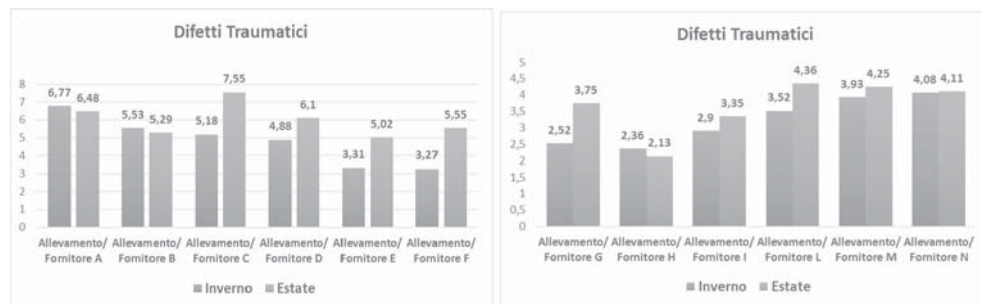
|                 | Peggior       | Migliore      | Estate        | Inverno       | Qualità Fornitore | Stagione |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------------------|----------|
| Voto Giudizio   | 5,49 ± 0,53   | 6,16 ± 0,46   | 5,91 ± 0,50   | 5,92 ± 0,66   | (p<) 0,001        | 0,02     |
| % Difetti       | 21,54 ± 10,45 | 10,84 ± 7,60  | 14,01 ± 9,27  | 15,47 ± 10,93 | 0,001             | 0,81     |
| Voto Difetti    | 4,55 ± 1,63   | 6,42 ± 1,53   | 5,71 ± 1,78   | 5,77 ± 1,81   | 0,001             | 0,04     |
| % Prima         | 44,22 ± 20,43 | 60,52 ± 28,71 | 46,22 ± 25,32 | 62,99 ± 26,34 | 0,001             | 0,001    |
| Voto Prima      | 5,32 ± 1,54   | 6,70 ± 1,55   | 5,95 ± 1,71   | 6,44 ± 1,65   | 0,001             | 0,001    |
| % Uniformità    | 40,26 ± 14,58 | 46,88 ± 16,80 | 42,71 ± 18,12 | 46,24 ± 14,12 | 0,001             | 0,02     |
| Voto Uniformità | 5,62 ± 1,31   | 6,45 ± 1,06   | 6,21 ± 1,27   | 6,08 ± 1,18   | 0,001             | 0,79     |
| Media Ponderata | 5,23 ± 0,72   | 6,38 ± 0,64   | 5,94 ± 0,74   | 5,97 ± 0,94   | 0,001             | 0,002    |
| N° di Partite   | 125           | 218           | 172           | 171           |                   |          |

**Tabella 5.** Analisi statistica dell'indice di valutazione delle partite.  
**Table 5.** Statistical analysis of the batches evaluation index.

Nella **tabella 5** è riportata l'effettiva analisi statistica dove sono stati inseriti i dati relativi alla percentuale e alla valutazione del giudizio degli operatori, dei difetti, dei prosciutti di prima scelta, dell'uniformità e infine della media ponderata finale dei quattro parametri in funzione della qualifica del fornitore (indipendentemente che sia estate o inverno) e della stagione (indipendentemente dalla qualifica del fornitore). Osservando la colonna relativa alla qualità dei fornitori, si nota che per ogni parametro c'è un valore di  $p < 0,001$ , quindi un valore altamente significativo; ciò indica che per ogni singolo parametro qualitativo i valori finali sono marcatamente e prevedibilmente differenti tra i fornitori peggiori e migliori. Invece, esaminando l'effetto della stagione sui singoli parametri si può osservare come la stagionalità è particolarmente significativa per i parametri corrispondenti alla % e voto dei difetti, alla % e voto di prima e alla % di uniformità; addirittura la % di prosciutti di prima scelta in estate risulta pari a 39,30 e in inverno corrisponde a 47,18 a causa di 6 fornitori che nel periodo estivo hanno conferito al macello partite contraddistinte da una % di prosciutti di prima scelta pari ad una valutazione di circa 4 mentre nel periodo invernale mediamente di 5. Dalla **tabella 5** si può osservare come mediamente il voto estivo è sempre inferiore al corrispettivo voto invernale nei singoli parametri e in modo particolare ciò si osserva nella % di difettosità, ciò potrebbe essere strettamente correlato all'influenza significativa della stagionalità sulla qualità delle cosce fresche.

### Analisi delle difettosità traumatiche dei dodici fornitori

Monitorando ed analizzando l'indice di valutazione finale dei dodici fornitori è stato riscontrato che numerose partite risultano essere fortemente penalizzate da un'elevata % di difettosità rilevate sulle cosce fresche; per tale motivo sono state monitorate costantemente le % di strappi, ematomi e morsi presenti sulle cosce suine di ogni singola partita conferita dai dodici fornitori nel medesimo periodo estivo ed invernale. Nel macello OPAS, per convenzione interna, i limiti di normalità in cui devono rientrare le % di strappi, ematomi e morsi (per partita) corrispondono rispettivamente all'1%, 1,5% e circa l'1%; superata questa soglia l'entità dei difetti traumatici è da considerarsi gravemente elevata.



**Grafici 2 - 3.** Confronto difettosità dei 6 fornitori peggiori e migliori tra periodo invernale ed estivo.  
**Graphs 2 - 3.** Comparison of defects of the 6 worst suppliers between winter and summer.

### Analisi statistica dei difetti traumatici delle partite analizzate in funzione della qualifica del fornitore (migliore vs peggior) e della stagione (estate vs inverno)

Anche per i difetti traumatici è stata applicata un'analisi della varianza a due vie sulle percentuali di strappi, ematomi e morsi nella stagione estiva ed invernale. Sono stati inseriti i difetti sopracitati in funzione della qualifica del fornitore (indipendentemente che sia estate o inverno) e della stagione (indipendentemente dal fornitore migliore o peggior). Osservando i livelli di significatività si è rilevato che, esclusi i morsi, tutti i difetti sono differenti in



modo significativo tra i fornitori peggiori e migliori; per quanto concerne la stagionalità si nota ugualmente una differenza significativa per i difetti totali ( $p < 0,014$ ) e ciò è strettamente correlabile a differenze nell'incidenza di ematomi ( $p < 0,001$ ). Questa differenza significativa tra le difettosità estive e invernali dimostrerebbe l'incidenza negativa della stagione estiva sulla qualità delle cosce fresche rifilate confermando che nei mesi più caldi è stata osservata una riduzione della qualità della carne come conseguenza dello stress da calore che coinvolge i suini nelle fasi di pre-macellazione (Mota-Rojas, D. et al., 2006).

|                           | Peggiori      |               | Migliori      |               |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                           | Estate        | Inverno       | Estate        | Inverno       |
| Strappi %                 | 0,012 ± 0,014 | 0,011 ± 0,022 | 0,007 ± 0,008 | 0,007 ± 0,008 |
| Ematomi %                 | 0,038 ± 0,022 | 0,024 ± 0,018 | 0,021 ± 0,015 | 0,018 ± 0,015 |
| Morsi %                   | 0,009 ± 0,014 | 0,008 ± 0,013 | 0,010 ± 0,013 | 0,007 ± 0,042 |
| Tot. Difetti Traumatici % | 0,059 ± 0,036 | 0,044 ± 0,033 | 0,038 ± 0,023 | 0,033 ± 0,044 |
| Tot. Difetti Genetici %   | 0,151 ± 0,086 | 0,149 ± 0,098 | 0,086 ± 0,067 | 0,067 ± 0,040 |
| Totale Difetti            | 0,210 ± 0,100 | 0,192 ± 0,111 | 0,123 ± 0,076 | 0,099 ± 0,062 |
| N° di Partite             | 78            | 105           | 127           | 115           |

|                           | Peggiori | Migliori | Estate | Inverno | Livello significativo |          |
|---------------------------|----------|----------|--------|---------|-----------------------|----------|
|                           |          |          |        |         | Qualifica Fornitore   | Stagione |
| Strappi %                 | 0,012    | 0,007    | 0,009  | 0,009   | 0,001                 | 0,72     |
| Ematomi %                 | 0,03     | 0,02     | 0,027  | 0,021   | 0,001                 | 0,001    |
| Morsi %                   | 0,009    | 0,009    | 0,009  | 0,008   | 0,99                  | 0,516    |
| Tot. Difetti Traumatici % | 0,05     | 0,035    | 0,046  | 0,038   | 0,001                 | 0,002    |
| Tot. Difetti Genetici %   | 0,15     | 0,076    | 0,11   | 0,106   | 0,001                 | 0,139    |
| Totale Difetti            | 0,2      | 0,112    | 0,156  | 0,143   | 0,001                 | 0,014    |
| N° di Partite             | 183      | 242      | 205    | 220     |                       |          |

**Tabella 6-7.** Analisi statistica dei difetti in relazione alla qualifica del fornitore e della stagione.  
**Tables 6-7.** Statistical analysis of defects in relation to the qualification of the supplier and the season.

**Incidenza dell'attesa pre-macellazione in stalla di sosta sulla % di difettosità traumatiche.**  
L'analisi statistica dell'incidenza dell'attesa pre-macellazione sui difetti sopra citati è stata effettuata sempre sulle partite dei dodici fornitori nei due mesi estivi ed invernali.

|                           | P             | S             | Livello significativo - P value |
|---------------------------|---------------|---------------|---------------------------------|
| Strappi %                 | 0,010 ± 0,018 | 0,008 ± 0,009 | 0,08                            |
| Ematomi %                 | 0,029 ± 0,022 | 0,019 ± 0,013 | 0,001                           |
| Morsi %                   | 0,011 ± 0,033 | 0,006 ± 0,010 | 0,037                           |
| Tot. Difetti Traumatici % | 0,050 ± 0,043 | 0,033 ± 0,021 | 0,001                           |
| Tot. Difetti Genetici %   | 0,126 ± 0,094 | 0,089 ± 0,064 | 0,001                           |
| Totale Difetti            | 0,176 ± 0,110 | 0,122 ± 0,075 | 0,001                           |
| N° di Partite             | 216           | 209           |                                 |

**Tabella 8.** Incidenza della sosta notturna sulle difettosità traumatiche.  
**Table 8.** Incidence of overnight stop on traumatic defects.



Nella **tabella 8** si nota che nelle partite appartenenti sia ai fornitori migliori che peggiori non è presente una significativa differenza tra P ed S per il parametro strappi (differenza tendenziale) mentre per la % dei morsi si rileva una bassa significatività. Al contrario è stata rilevata una differenza altamente significativa ( $p < 0,001$ ) nella % di ematomi, nella % di difettosità traumatiche e genetiche e nella % totale di difetti rispetto al tempo di attesa pre-macellazione. Ciò dimostra che la sosta notturna può rappresentare un fattore predisponente per una maggiore % di difettosità traumatiche presenti sulle cosce fresche rifilate. Ciò confermerebbe i risultati di alcuni studi che hanno evidenziato, nei suini macellati il giorno successivo allo scarico, una maggiore presenza di lesioni alla pelle in tutte le parti della carcassa, rispetto ai suini macellati poco dopo la fase di scarico (Guàrdia, M. D., et al., 2009), (Nanni Costa, L., et al., 2002).

## CONCLUSIONI

Alla luce delle informazioni raccolte, è chiaro che l'applicazione del nuovo indice di valutazione può rappresentare un fondamentale strumento di analisi qualitativa e di gestione integrale delle partite suine in entrata, dando la possibilità all'azienda di macellazione di ottenere informazioni spendibili da un punto di vista commerciale e lungo tutta la filiera, orientando la scelta delle partite in entrata in funzione delle effettive caratteristiche qualitative della coscia fresca rifilata e quindi definendo un valore della partita in termini reali di qualità. Allo stesso modo l'analisi sulle difettosità delle cosce ha confermato che i difetti di origine traumatica rappresentano una grave problematica correlata ai trattamenti pre-macellazione e in modo particolare è stato evidenziato che la sosta notturna dei suini e la stagione estiva possono influenzare la loro prevalenza.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bottacini M., Scollo A., A. Edwards S., Contiero B., Veloci M., Pace V., Gottardo F. Skin lesion monitoring at slaughter on heavy pigs (170 kg): Welfare indicators and ham defects PLoS One.2018; 13(11);
2. CSQA, 2019. Piano dei Controlli del Prosciutto di Parma DOP. DPC061, rev 0 del 12.12.2019. [www.csqa.it](http://www.csqa.it);
3. Faucitano, L., Geverink, N.A., 2008. Effects of preslaughter handling on stress response and meat quality in pigs. In: L. Faucitano and A.L. Schaefer (eds.), The welfare of Pigs: from Birth to Slaughter, Wageningen Academic Publ., pp 197-224;
4. Guàrdia, M. D., Estany, J., Balasch, S., Oliver, M. A., Gispert, M., Diestre, A.. 2009.
5. Risk assessment of skin damage due to pre-slaughter conditions and RYR1 gene in pigs. Meat Sci. 81: 745-751;
6. Mota-Rojas, D.; Becerril, M.; Lemus, C.; Sanchez, P.; Gonzalez, M.; Olmos, S.A.; Ramirez, R.; Alonso-Spilsbury, M. Effects of mid-summer transport duration on pre- and post-slaughter performance and pork quality in Mexico. Meat Sci. 2006, 73, 404–412;
7. Nanni Costa, L., Lo Fiego, D. P., Dall'olio, S., Davoli, R., Russo, V., 2002. Combined effects of pre-slaughter treatments and lairage time on carcass and meat quality in pigs of different halothane genotype. Meat Sci. 61: 41-47;
8. Rosenvold, K., Andersen, H. J., 2003. Factors of significance for pork quality—a review. Meat Sci. 64:219-237;

la Salute Animale per la Salute dell'Uomo



FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)  
Tel. 051 6512711 - [www.fatro.it](http://www.fatro.it) - [info@fatro.it](mailto:info@fatro.it)



---

# VACCINAZIONE SUINETTI: FEEL THE BENEFITS!

---



Il Riferimento  
nella **Prevenzione**  
in **Salute Animale**

# Hipradermic® 3.0



È TEMPO DI  
DARE IL GIUSTO  
PESO ALLA  
COMODITÀ

LA VACCINAZIONE  
PER SUINI NON È MAI  
STATA COSÌ PRECISA,  
SEMPLICE O RAPIDA



Il Riferimento  
nella **Prevenzione**  
in **Salute Animale**

**HIPRA ITALIA**

Via Enrico Mattei, 2 25030 Coccaglio (BS) Italy  
Tel.: (+39) 030 7241821 · Fax: (+39) 030 7700881 · [italia@hipra.com](mailto:italia@hipra.com) · [www.hipra.com](http://www.hipra.com)





[www.huvepharma.com](http://www.huvepharma.com)

**Contatto per l'Italia:**

Paolo Mondin: 339/7385156  
[paolo.mondin@huvepharma.com](mailto:paolo.mondin@huvepharma.com)

HUVEPHARMA EOOD • 3<sup>a</sup> NIKOLAY HAYTOV STR • 1113 SOFIA • **BULGARIA** • P +359 2 862 5331 • F +359 2 862 5334 • [SALES@HUVEPHARMA.COM](mailto:SALES@HUVEPHARMA.COM)  
HUVEPHARMA N.V. • UITBREIDINGSTRAAT 80 • 2600 ANTWERP • **BELGIUM** • P +32 3 288 1849 • F +32 3 289 7845 • [CUSTOMERSERVICE@HUVEPHARMA.COM](mailto:CUSTOMERSERVICE@HUVEPHARMA.COM)



## Your ideal partner for health management is Kemin

We provide scientifically proven solutions and services to allow a profitable preventive strategy on farm while committing to responsible use of medicines. At Kemin, disease prevention and health promotion is our core business.

Visit [kemin.com/emena](https://kemin.com/emena)  
or scan the QR code:











# LIVISTO

**12 Aziende in  
9 Paesi che operano con  
500 dipendenti in  
129 mercati con quasi  
100 anni di storia**

Il Gruppo **LIVISTO** è attivo nel settore della salute animale, sviluppando e commercializzando **prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità** per animali da reddito e domestici.

**TREI S.p.A.** è un'azienda farmaceutica italiana fondata nel 1968 con sede a Rio Saliceto (Reggio Emilia) e dal 2014 è entrata a far parte del Gruppo LIVISTO.

Lo **stabilimento produttivo di TREI** è suddiviso in tre aree:

- produzione **medicinali veterinari**
- produzione **medicinali contenenti  $\beta$ -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 **Livimilk**
- 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](mailto:trei@treivet.com) - Tel: +39 0522 640711

**Along with you**

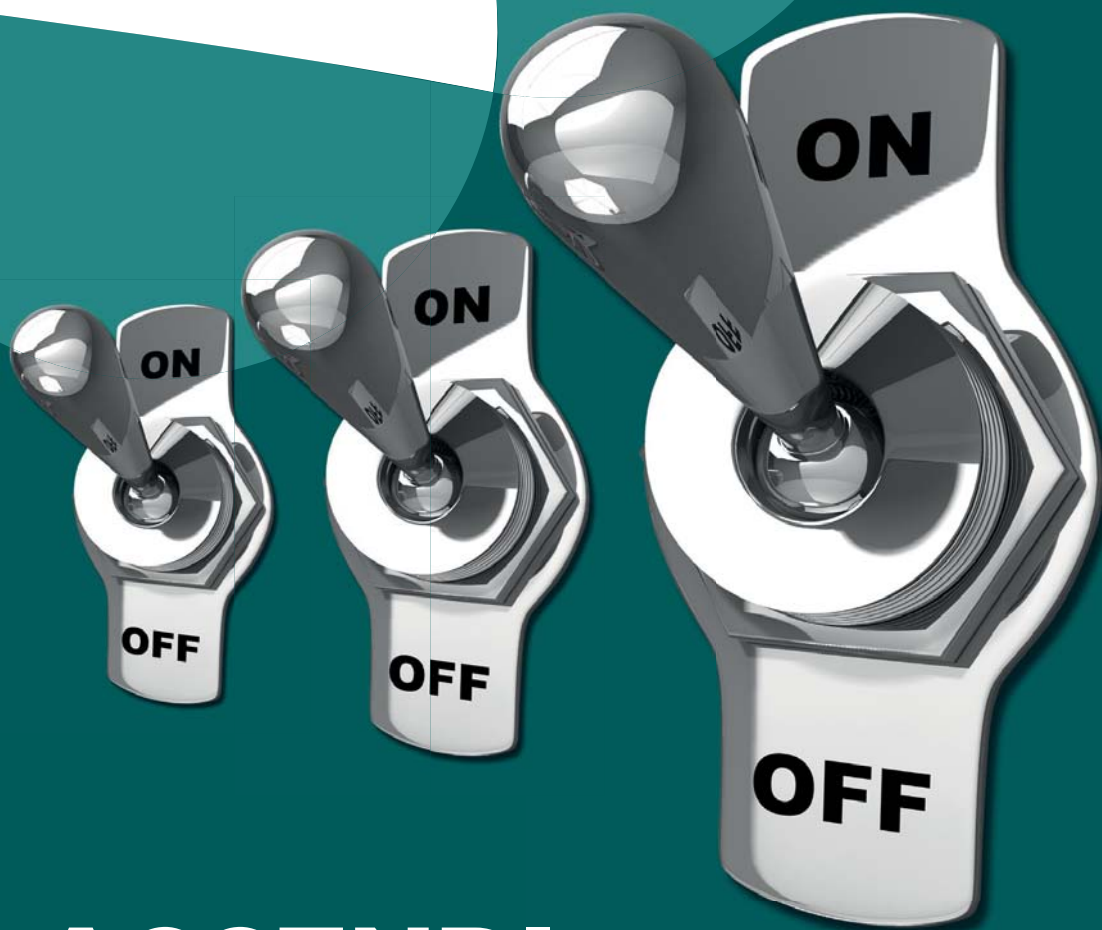
**[livisto.com](http://livisto.com)**



**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!**



Chi ricerca, trova.

---



[vetagro.com](http://vetagro.com)



Inquadra il codice  
per guardare il nostro  
video corporate.

Seguici sui nostri social





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



## 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.





# RISPETTIAMO LA NATURA, DI OGNI MAIALE.



**ZOETIS SI IMPEGNA AD ACCRESCERE LA SOSTENIBILITÀ**  
della produzione di carne suina, proponendo soluzioni innovative  
per una alimentazione sicura, di qualità e responsabile.



## NOTE



## NOTE



Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS per il 2021  
si svolgono con il contributo di:

