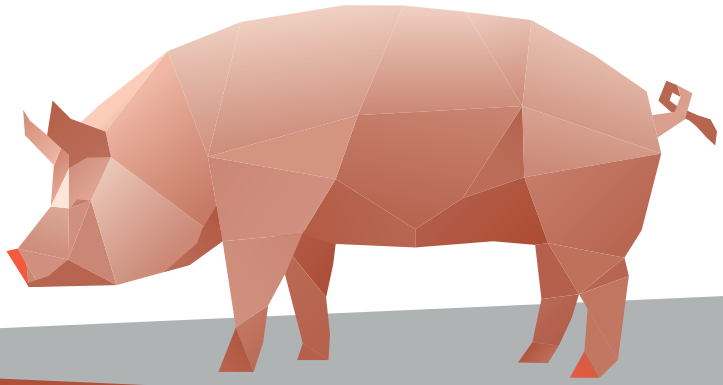
ATTI DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

XLVII MEETING ANNUALE

Lazise (VR) 9-10 Giugno 2022

Hotel Parchi del Garda



SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

ATTI
DELLA SOCIETÀ ITALIANA DI PATOLOGIA ED ALLEVAMENTO DEI SUINI

2022

Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini

Edito da SIPAS. Tutti i diritti riservati.

Pubblicato da SIPAS.

Stampato da Litografia La Ducale Srl in Parma nel mese di Maggio 2022.

ISBN 978-88-903311-9-0

INDICE

Prefazione ..... p. 19

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

ATBFree NELL'ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO: REALTÀ O UTOPIA? IL PUNTO DI VISTA DELLA FILIERA DAL PRODUTTORE AL CONSUMATORE

Parma, 26 Novembre 2021

ANTIBIOTICI IN ALLEVAMENTO, GESTIONE E COMUNICAZIONE AL SERVIZIO DI SOSTENIBILITÀ E TRASPARENZA
Bianco Elisa ..... p. 23

BENESSERE ANIMALE E CONSUMATORI: ASCOLTARE OGGI PER MIGLIORARE DOMANI
Giorgi Gian Piero ..... p. 25

ANTIBIOTIC FREE NELL'ALLEVAMENTO DEL SUINO ITALIANO: IL CONSUMATORE E IL RUOLO DELLA FILIERA
Montrasi Alberto ..... p. 27

ATTI DEL XLVII MEETING ANNUALE

Lazise (VR), 9-10 Giugno 2022

PARTO LIBERO O GABBIA PARTO TEMPORANEA? PANORAMICA SU LEGISLAZIONE, APPLICAZIONE DELLE NORME E DECISIONI CHIAVE NELLA SCELTA DI UN'ALTERNATIVA ALLA GABBIA PARTO
Baxter Emma M. ..... p. 33

PROGRAMMI ALIMENTARI PER SUINETTI DOPO LO SVEZZAMENTO SENZA L'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI E ZNO
Molist Francesc ..... p. 39

SVEZZAMENTO SENZA OSSIDO DI ZINCO: LA PROSPETTIVA DANESE
Sørensen Ulrich Kristina ..... p. 45

DEMEDICALIZZAZIONE DA OSSIDO DI ZINCO: UN PROBLEMA O UN'OPPORTUNITÀ? PRIMA PARTE
Conte Fabrizio ..... p. 51

DEMEDICALIZZAZIONE DA OSSIDO DI ZINCO: UN PROBLEMA O UN'OPPORTUNITÀ? SECONDA PARTE
Vincenzi Riccardo ..... p. 57

LO SCORING POLMONARE AL MACELLO NELLA REALTÀ DEL SUINO PESANTE ITALIANO.
Dottori Michele ..... p. 63

UTILIZZO DELLO SCORE POLMONARE SUL CAMPO APPLYING THE SLAUGHTER SCORE IN THE FIELD
Scollo Annalisa ..... p. 67

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Lazise (VR), 9-10 Giugno 2022

STUDIO *INTRA-FARM* DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* IN SUINI COMMERCIALI
Cordioli B., Bacchin C., Drigo I., Alborali G.L., Tonni M., Guarneri F., Vio D., Ustulin M., Zoppi S., Tonon F., Bano L. ..... p. 71

DETERMINANTI DELL' EPIDEMIOLOGIA DEL PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN UNA GRANDE FILIERA INTEGRATA: PUNTI DI DEBOLEZZA O OPPORTUNITÀ DI AZIONE?
Franzo G., Barbierato G., Pesente P., Legnardi M., Tucciarone C.M., Sandri G., Drigo M. ..... p. 79

VERIFICA DELLA PRESENZA DI ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN SUINI REGOLARMENTE MACELLATI IN FRIULI VENEZIA GIULIA E PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO
Ustulin M., Colorio S., Targhetta C., Ferino L., Idrizi I., La Spisa M., Vio D. ..... p. 91

VALUTAZIONE PRELIMINARE DI UN PROTOCOLLO DI VACCINAZIONE PRECOCE CON VACCINO STABULOGENO CONTRO STREPTOCOCCUS SUIS
Ustulin M., Giorgiutti M., Gagliazzo L., Paniccia' M., Cucco L., Severi G., Tagliente D., Ghiriti A., Vio D. ..... p. 97

PREVALENZA DI AGENTI EZIOLOGICI IN CASI DI ABORTO IN LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021
Bosco C., Torreggiani C., Prosperi A., Chiapponi C., Faccini S., Rosignoli C., Pupillo G., Salogni C., Bassi P., Maisano A.M., Luppi A. ..... p. 103

STUDIO PRELIMINARE PER LA CREAZIONE DI UNA FILIERA DI SUINI ANTIBIOTIC-FREE: MONITORAGGIO DEGLI AGENTI BATTERICI E VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA
Valentini F., Cappuccio P., Calisesi L., Luppi A., Tosi G., Chiusi A., Ruscelli R., Bertasi B., Mattei S., Fiorentini L. ..... p. 113

ANDAMENTO DEL CONSUMO DI ANTIBIOTICI IN FILIERE SUINICOLE ITALIANE CARATTERIZZATE DAL DIVERSO STATO ENDEMICO PER LA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA SUINA
Amatucci L., Ruggeri R., Romanelli C., Sandri G., Luise D., Canali M., Bosi P., Trevisi P. p. 127

PUNTEGGIATURA DELLA POLMONITE NEL SUINO: METODI TRADIZIONALI E INNOVATIVI A CONFRONTO
Romano A., Hattab J., Bonicelli L., Rosamilia A., Liuzzo G., Capobianco Dondona A., Bernabò N., Marruchella G. ..... p. 137

GESTIONE IN ALLEVAMENTO DELLA MALATTIA DEGLI EDEMI ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI STATISTICHE DI PROCESSO PER IL MONITORAGGIO ROUTINARIO DELLA PRODUZIONE
Scollo A., Rusinà A., Cavazzoni A., Mazzoni C., Cossettini C. ..... p. 141

GLI EFFETTI DELL'ALLEVAMENTO DEL SUINO A CODA LUNGA SU LARGA SCALA: UN *CROSS-SECTIONAL STUDY* ITALIANO AL MACELLO
Scollo A., Rusinà A., Cavazzoni A., Contiero B., Gottardo F. ..... p. 151

CARENZA DI RIBOFLAVINA IN DUE AZIENDE BIOLOGICHE ITALIANE
RIBOFLAVIN DEFICIENCY IN TWO ITALIAN ORGANIC FARMS
Torreggiani C., Franchi L., Borri E., Prosperi A., Luppi A. ..... p. 159

INDAGINI *IN SITU* SULLA PATOLOGIA INTESTINALE DEL SUINO: RISULTATI PRELIMINARI DA UN PERCORSO DIAGNOSTICO PER *LAWSONIA INTRACELLULARIS*
D'Annunzio G., Ostanello F., Jacumin N., Leotti G., Tommasini N., Alborali G.L., Tonni M., Formenti N., Luppi A., Vio D., Capucchio M.T., Perotti M., Zoppi S., Giorgiutti M., Mandrioli L., Sarli G. ..... p. 165

PREMIO PIERFILIPPO GUADAGNINI 2022

VINCITORE

EPIDEMIOLOGIA DELLE NUOVE SPECIE DI PARVOVIRUS DEL SUINO IN FOCOLAI DI REPRODUCTIVE FAILURE IN ITALIA
Faustini G., Tucciarone C.M., Donneschi A., Franzo G., Boniotti B., Alborali G.L., Drigo M. ..... p. 179

PREMIO
CASIMIRO TAROCCO 2022

VINCITORE

EFFETTO DELLA RIDUZIONE DELLA DISPONIBILITÀ DI ALIMENTO E DEL LIVELLO DI AMMINOACIDI NELLA DIETA SU COMPORTAMENTO ALIMENTARE, PRESTAZIONI PRODUTTIVE, ESCREZIONE DI NUTRIENTI E QUALITÀ DELLA CARNE DI MAIALI APPARTENENTI A DIVERSI TIPI GENETICI
Carco' G. ..... p. 189

CANDIDATI

INDAGINE SUL BENESSERE ANIMALE IN ALLEVAMENTI SUINICOLI EMILIANI
Cavazzoni A. ..... p. 203

VALUTAZIONE DEL CARICO ALLOSTATICO NELLE SCROFE PRE-PARTO
EVALUATION OF THE ALLOSTATIC LOAD IN SOWS PRE-DELIVERY
Quai F., Mazzoni C., Cotticelli A., Peric T. ..... p. 219

PREMIO
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2020

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) E DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA BATTERICIDA (MBC) MEDIANTE METODO DI DILUIZIONE IN BRODO DI CINQUE DIVERSI DISINFETTANTI
Montagnin C., Cawthraw S., Davies R., Smith R.P., Ring I., De Lucia A., Ostanello F., Martelli F. ..... p. 237

POSTER

EFFETTI POSITIVI DEI BETA GLUCANI DA ALGHE SULLA REPLICAZIONE VIRALE DI PRRSV E ASFV NEI MACROFAGI ALVEOLARI POLMONARI (PAM)
Mattuzzi S., De Leon A., Van Hamme V., Neto R., Kirwan S., Tan J., Nguyen T., Thanh H., Vu Hoang D. ..... p. 255

UTILIZZO DI ACIDO FORMICO INCAPSULATO, ACIDO CITRICO, AROMI FUNZIONALI E BACILLUS SP. PB6 IN UNA DIETA PREMIUM PER SVEZZARE CON SUCCESSO I PICCOLI SUINETTI SENZA MEDICAZIONE CON OSSIDO DI ZINCO
Mattuzzi S., Bukowska P. , Van Hamme V., Guetta N., Carlson D. ..... p. 261

TRACCIABILITÀ DIGITALE ED ACQUISIZIONE DATI NEL SUINO: INDAGINI PRELIMINARI
Di Giuseppe P., Hattab J., Gabrielli L., Marruchella G., Odintsov Vaintrub M. ..... p. 271

ANDAMENTO TEMPORALE DEL CONSUMO DI ANTIMICROBICI IN SVEZZAMENTI DEL NORD ITALIA NEL 2016-2019
Romeo C., Scali F., Santucci G., Maisano A., Guadagno F., Formenti N., Tonni M., Alborali G.L. ..... p. 277

UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI SOSTANZE AROMATIZZANTI IN SUINETTI INFETTATI ARTIFICIALMENTE CON *ESCHERICHIA COLI* F4 ALLO SVEZZAMENTO
Tugnoli B., Bonetti A., Piva A., Grilli E. ..... p. 287

LA RESISTENZA ALLE MALATTIE NEL SUINO PESANTE ITALIANO: UTILIZZO DEL MODELLO THRESHOLD PER LA STIMA DELLE COMPONENTI DI VARIANZA E DEL VALORE GENETICO DEI RIPRODUTTORI
Cappelloni M., Gallo M., Cesarani A. ..... p. 295

CORRELAZIONE TRA LE LESIONI DELLA CARCASSA E LE LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE POLMONARI RILEVATE AL MACELLO IN SUINI SOTTOPOSTI O NO A CAUDOTOMIA
Amatucci L., Bosco C., Luise D., Luppi A., Virdis S., Trevisi P. ..... p. 301

VALUTAZIONE DEL CONSUMO DI ANTIBIOTICO IN ALLEVAMENTO SUINICOLO E ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *ESCHERICHIA COLI* INDICATORI FECALI: DATI PRELIMINARI IN TRE ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA
De Bene A.F., Bosco C., De Lucia A., Matteuzzi A., Luppi A., Scali F., Rugna G., Bassi P. ..... p. 311

PRINCIPALI CAUSE DI MORTE NEGLI ALLEVAMENTI SUINI DEL PIEMONTE: INDAGINI ANATOMO-ISTOLOGICHE E MICROBIOLOGICHE
Cucco I., Colombino E., Perotti M., Zoppi S., Alborali G.L., Bonvegna M., Caruso C., Goria M., Mandola L., Mannelli A., Mioletti S., Salogni C., Sona B., Sparasci Oriana A., Tarantola M., Tomassone L., Tonni M., Tursi M., Vercelli C., Zoccola R., Dondo A., Capucchio Maria T. ..... p. 327

BENEFICI DI HEPARENOL (MANGIME COMPLEMENTARE A BASE DI COLINA CLORURO ED ESTRATTI VEGETALI) SOMMINISTRATO ALLE SCROFE IN PREPARTO SULLA PERCENTUALE DI SUINETTI NATI MORTI
Engelen B. ..... p. 335

FIBROSARCOMI ASSOCIATI ALLE MARCHE AURICOLARI NEL SUINO: CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE
Rosamilia A., Hattab J., Capezzuto S., Marruchella G. ..... p. 339

Boehringer Ingelheim

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

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
- Diarrea Neonatale del suinetto
- 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

chemifarma®

CON LA **PESTE SUINA** NON SI SCHERZA

LINEA BIOSICUREZZA

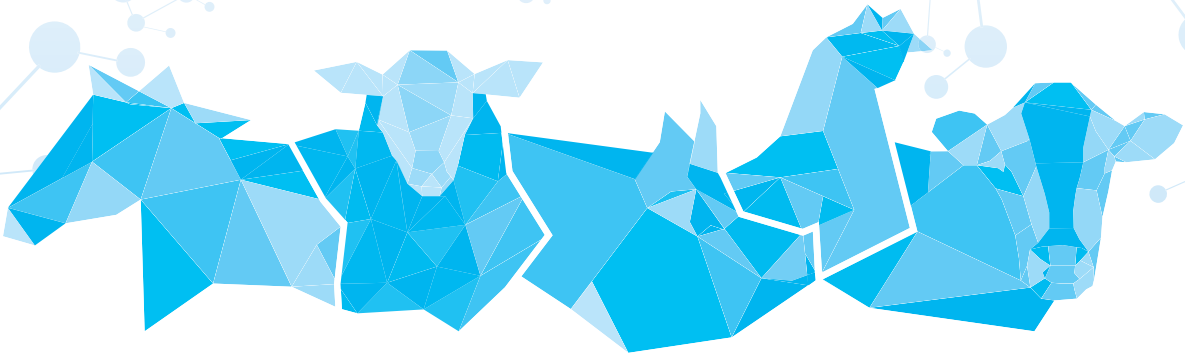
PRESIDI CERTIFICATI

PER SCONGIURARE LA **MINACCIA** UTILIZZA SOLO PRODOTTI TESTATI ED EFFICACI

Per maggiori informazioni sui biocidi Chemifarma testati efficacemente contro la peste suina:

tel. **0543 796464** - e-mail: info@chemifarma.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 • www.dopharma.it

Dopharma Italia srl - Firenze - tel, 348 9372724 - servizioclienti@dopharma.it

Sinergie per un perfetto equilibrio

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

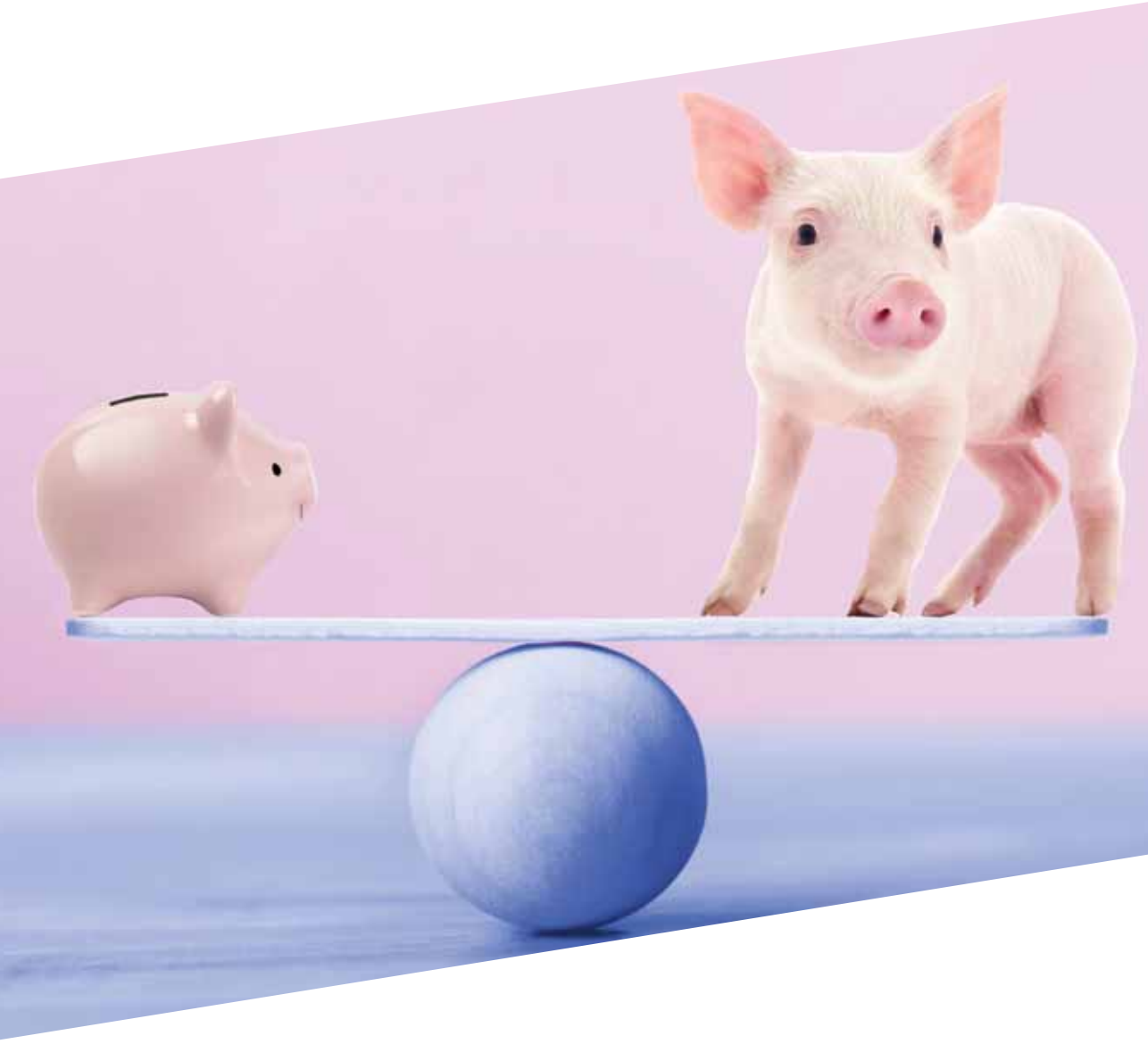
✓ prodotti nutrizionali tecnologici e funzionali
✓ prodotti per la disinfezione e per la lotta alle micotossine
✓ prodotti farmaceutici efficaci, per quando davvero serve medicare.

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

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

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

La sua salute. Il tuo business. Proteggili entrambi.



La diarrea post-svezzamento da *E.coli* ETEC, **oltre a ridurre la crescita**[1,2,3], **é fra le più comuni cause di mortalità** nei suinetti svezzati con un'incidenza fino a 1,5-2%. **Il suo impatto economico** può raggiungere **5€ per suinetto**[4]. **Oggi l'alternativa c'è**: puoi proteggere la salute e il benessere dei tuoi suinetti, così come il tuo business, senza ricorrere all'ossido di zinco e riducendo l'uso di antibiotici, per un allevamento efficiente e sostenibile.

1.Amezcua R et al. 2002 | 2.Hampson DJ. 1994 | 3.Zhang W et al. 2007 | 4.Tokach LM et al. 2000 |
Elanco e la barra diagonale sono marchi registrati di Elanco o sue affiliate. ©2022 Elanco | PM-IT-22-105

Elanco™

Elanco Italia S.p.A. - Via di Breme, 13 - 20156 Milano - italia_elanco@elanco.com

la Salute Animale per la Salute dell'Uomo

ONE HEALTH
ECO HEALTH

FATRO - Industria Farmaceutica Veterinaria - 40064 Ozzano dell'Emilia (BO)
Tel. 051 6512711 - www.fatro.it - info@fatro.it

LA SALUTE ANIMALE PER LA SALUTE DELL'UOMO
FATRO

PREFAZIONE

Cari Soci,

è con vivo piacere che vi do il benvenuto, a nome di tutto il Consiglio Direttivo, al 47°Meeting Annuale della SIPAS. Non ho dubbi sul fatto che anche questa volta sarete numerosi e che la vostra partecipazione sarà attenta e vivace.
Dopo anni di difficoltà, nel 2019 la suinicoltura italiana aveva iniziato a manifestare segnali estremamente positivi, con una ripresa della redditività degli allevatori italiani. Purtroppo, negli anni successivi questa tendenza non è stata confermata: prima l'emergenza sanitaria causata dalla pandemia di COVID-19 e, successivamente, l'aumento drammatico dei costi dell'energia e delle materie prime causato dal conflitto in Ucraina hanno riportato la suinicoltura italiana a una condizione di estrema incertezza. Ma è soprattutto l'emergenza della Peste Suina Africana in Liguria e Piemonte a preoccupare: Francesco Feliziani (Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per le pesti suine – IZSUM e più volte relatore ai nostri meeting) ha affermato pubblicamente che "Dove la PSA diventa endemica la suinicoltura muore". Possiamo o meno essere d'accordo con l'affermazione, volutamente provocatoria, del dott. Feliziani; resta tuttavia chiara la necessità, per tutti gli operatori del settore e, in particolare, per i veterinari e gli allevatori, di chiedere che venga fatto tutto il possibile per contenere il focolaio ed eradicare l'infezione in tempi rapidi. L'endemizzazione della PSA nei cinghiali, con un probabile coinvolgimento degli allevamenti intensivi, porterebbe ad un danno economico per l'intero comparto stimato in circa 60 milioni di euro per ogni mese di blocco delle esportazioni di carne e prodotti e riporterebbe l'orologio della suinicoltura italiana indietro di almeno 30 anni. Non ce lo possiamo permettere.
Con lungimiranza, fin dall'ormai lontano 2012, la SIPAS ha contribuito ad informare ed aggiornare i sui Soci sull'evoluzione mondiale dell'epidemiologia della PSA. Credo fermamente nella necessità che la SIPAS continui a tenere viva l'attenzione sul problema, fornendo ogni possibile contributo utile a prevenire la diffusione della malattia.
In questi difficili anni di pandemia, la SIPAS è riuscita a mantenere vivo il rapporto con i soci e le aziende sponsor (11 webinar organizzati tra maggio 2020 e giugno 2021) e a continuare a sostenere economicamente la formazione in Italia e all'estero di giovani colleghi. Ritengo che sia un segnale importante di due aspetti qualificanti della Società: la capacità di SIPAS di adattarsi ai cambiamenti pur continuando le proprie attività e la capacità di individuare gli argomenti di discussione più interessanti. Auspico, in particolare, che lo strumento dei webinar possa essere utilizzato ancora in futuro (anche in assenza di restrizioni sanitarie) perché rappresenta una nuova e interessante opportunità per veicolare rapidamente informazioni e aggiornamenti ai Soci.
Nel corso del Meeting Annuale 2022 ci sarà anche un importante momento della vita della SIPAS: il Consiglio Direttivo dovrà essere rinnovato e due dei consiglieri uscenti (Annalisa Scollo e io) non saranno rieleggibili. Dopo due mandati, lasciatemi dire che un po' mi dispiace: questi sei anni di CD sono stati per me un'importante occasione di crescita professionale e umana. Spero che il prossimo CD continui ad avere una grande attenzione nei confronti della formazione, informazione e aggiornamento professionale e culturale (in presenza o a distanza) che rappresentano gli strumenti fondamentali per rispondere rapidamente ed efficacemente ai cambiamenti.
In oltre 40 anni di attività, la SIPAS ha sempre dimostrato di possedere, al suo interno, le capacità necessarie a riconoscere i cambiamenti e la forza per governarli. Mi piace pensare che questi talenti non solo siano ancora presenti, ma che possano essere efficacemente utilizzati per progettare nuove attività e nuovi rapporti con chi si occupa di suinicoltura, a qualsiasi livello. Ritengo che la SIPAS debba consolidare il proprio ruolo culturale nel panorama suinicolo italiano.
Per raggiungere questo obiettivo è però necessario ragionare, progettare e scegliere in anticipo quale sarà la strada da percorrere nei prossimi anni. Per questo vi chiediamo, cari Soci, un contributo costruttivo che permetta a tutti, partendo dalla valutazione di quello che siamo oggi, di decidere cosa ci piacerebbe che la SIPAS diventasse domani. Solo attraverso il continuo confronto, aperto alla discussione, si può ambire ad una costante crescita professionale e ad un ampliamento delle conoscenze.
Da ultimo, un ringraziamento sincero va a tutti i Soci, alla Segreteria Delegata e alle Aziende sponsor; tutti hanno, con ruoli diversi, continuato generosamente a supportare la SIPAS anche in questi difficili anni di pandemia.

Il Segretario
Fabio Ostanello

ATTI DELLA GIORNATA DI STUDIO

ATBFree NELL'ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO: REALTÀ O UTOPIA? IL PUNTO DI VISTA DELLA FILIERA DAL PRODUTTORE AL CONSUMATORE

Parma, 26 Novembre 2021

ANTIBIOTICI IN ALLEVAMENTO, GESTIONE E COMUNICAZIONE AL SERVIZIO DI SOSTENIBILITÀ E TRASPARENZA

BIANCO ELISA

Responsabile del Settore Alimentare in Italia, CIWF

Spinte dal crescente interesse da parte dei consumatori e dalla necessità di affrontare il grave problema dell'antibioticoresistenza, le filiere hanno cercato di trovare una soluzione che potesse rispondere alle preoccupazioni delle persone, salvaguardando al tempo stesso la loro salute. Una delle principali soluzioni messe in atto nelle filiere italiane riguarda lo sviluppo di sistemi di etichettatura con il claim "allevato senza l'uso di antibiotici"; per valutare se si tratti effettivamente di una soluzione sostenibile ed efficace, è innanzitutto fondamentale analizzarne gli impatti sulle filiere, sul benessere degli animali e sulla trasparenza delle informazioni trasmesse ai consumatori.

Se, da un lato, è vero che animali allevati con migliori condizioni di benessere si ammalano meno, non bisogna tuttavia essere indotti a pensare che non si ammalino mai. Come riportato infatti da molteplici organismi istituzionali, tra cui l'OMS e l'OIE, gli antibiotici rimangono risorse essenziali per garantire il benessere e la salute umana e animale, e, anche nel migliore allevamento possibile, può sempre capitare che un animale si ammali ed è fondamentale che, quando questo accade, l'animale venga trattato nel modo più tempestivo ed efficace possibile.

In generale, analizzando le strategie che sono state attuate per sviluppare filiere i cui prodotti fossero etichettabili come "allevati senza antibiotici" è possibile identificarne tre principali:

- il miglioramento delle condizioni di benessere animale, biosicurezza e gestione
- l'utilizzo di strategie di filiera, come la compensazione degli antibiotici con altre tipologie di composti non ufficialmente classificati come antibiotici, il miglioramento della tracciabilità e l'esclusione dalla filiera di animali/gruppi trattati, la limitazione della dicitura "senza antibiotici" alle ultime X settimane/mesi di vita
- l'accettazione di percentuali di mortalità più elevate

Diverse indicazioni porterebbero a pensare che i consumatori siano convinti che i prodotti etichettati come "senza antibiotico" provengano da allevamenti con migliori standard di benessere, tuttavia, vista la grande diffusione del senza antibiotico e, allo stesso tempo, la grande diffusione di sistemi intensivi ad alte densità o che addirittura non rispettano la legge (come nel caso del taglio della coda), è molto difficile avere certezza che al senza antibiotico corrispondano standard superiori di benessere animale, a meno che non sia chiaramente indicato in etichetta quali miglioramenti sono stati attuati. Se il "senza antibiotici" viene raggiunto con strategie di filiera, piuttosto che attraverso un significativo miglioramento degli standard di allevamento, quali impatti ha questo sulle filiere, sui consumatori e, soprattutto, sulla limitazione dell'antibioticoresistenza?

L'adozione di strategie di filiera come quelle menzionate sopra non contribuisce ad apportare quelle informazioni indispensabili per affrontare in maniera strutturata il problema dell'antibioticoresistenza. Continuano, infatti, a non essere presenti informazioni quantitative e qualitative sulle quantità e tipologie di antimicrobici utilizzati, soprattutto nelle prime fasi di vita e nelle scrofe, un aspetto indispensabile per potere sviluppare un piano di gestione responsabile del farmaco che contribuisca in maniera efficace alla riduzione del fenomeno dell'antibioticoresistenza. Senza queste informazioni, ad esempio, non è possibile capire se una eventuale riduzione di antibiotici stia effettivamente contribuendo alla lotta

all'antibioticoresistenza, perché la riduzione del consumo di antibiotici potrebbe essere stata semplicemente compensata da un aumento di altri trattamenti che però continuano a rivestire un ruolo attivo nell'insorgenza di resistenze (come nel caso dell'ossido di zinco), o potrebbe essere legata a un aumentato utilizzo di antibiotici critici per la salute umana che, avendo dosaggi minori, farebbero registrare minori volumi di impiego quando invece l'impatto sulla futura efficacia di queste molecole è enorme.
In tema di benessere animale, il fatto che l'obiettivo della filiera sia allevare il maggior numero di animali possibile senza che siano stati effettuati trattamenti antibiotici, potrebbe portare al rischio di ritardi nel trattare gli animali una volta che insorgono i primi segnali di malattia. In uno scenario come questo, non solo verrebbe a mancare il rispetto di una delle cinque libertà fondamentali che definiscono il benessere animale, ma si causerebbero agli animali aumenti significativi dei livelli di stress, con uno scenario che potrebbe diventare particolarmente critico nel caso di suini allevati con la coda lunga, come previsto dalla normativa, dove si potrebbe assistere ad aumenti potenzialmente drammatici di incidenza di lesioni, mortalità e declassamento delle carcasse per l'incidenza di ascessi lungo la colonna.
Da ultimo, l'adozione di strategie di filiera per etichettare i prodotti come "allevato senza antibiotici" senza che questo corrisponda a un miglioramento significativo del benessere degli animali pone grosse criticità in merito alla trasparenza delle informazioni comunicate ai consumatori, indotti invece a pensare che senza antibiotici voglia dire migliore benessere. Questo aspetto porta con sé il rischio enorme di perdere la fiducia dei consumatori nel momento in cui dovesse emergere che la realtà produttiva è molto diversa da quella che sono stati indotti a immaginare fino a quel momento, un aspetto che può finire per penalizzare maggiormente proprio quegli allevatori che producono già con standard migliori.
Dati alla mano, preoccupa particolarmente il fatto che, nonostante siano ormai diversi anni che i prodotti etichettati come "allevati senza antibiotici" sono disponibili sul mercato, l'Italia continua comunque a essere il terzo paese in UE per consumo di antibiotici negli allevamenti, dando un'indicazione chiara della necessità di sviluppare strategie di gestione degli antimicrobici che siano più solide, strutturate e di lungo respiro rispetto a quelle portate avanti finora.
Una soluzione più sostenibile ed efficace dell'adozione di strategie di etichettatura "allevato senza antibiotico" è rappresentata dallo sviluppo di politiche aziendali che prevedano un utilizzo responsabile del farmaco e lo sviluppo di piani di monitoraggio, che permettano di conoscere quali e quanti antibiotici sono stati utilizzati, fissando parallelamente obiettivi di riduzione progressiva. D'altro canto, le comunicazioni ai consumatori dovrebbero essere basate più sul racconto dei miglioramenti effettuati in allevamento, che non unicamente sul non utilizzo di antibiotici, soprattutto attraverso un sistema di etichettatura chiaro che permetta di differenziare i diversi metodi di allevamento. Un principio che dovrebbe essere impiegato anche nell'assegnazione di eventuali premialità agli allevatori, che dovrebbero essere basate sul raggiungimento di miglioramenti strutturali e pratici volti a migliorare il benessere degli animali e a minimizzare il rischio di patologie, più che non sull'eventualità che alcuni animali possano o meno ammalarsi.

BENESSERE ANIMALE E CONSUMATORI: ASCOLTARE OGGI PER MIGLIORARE DOMANI

GIORGI GIAN PIERO

Coop Italia

Focus dell'intervento di Piero Giorgi, responsabile qualità carni Coop Italia, è stata la presentazione di una indagine condotta su consumatori di carne in merito alle richieste che vengono poste all'attenzione della GDO.

Durante l'esposizione è stato mostrato come Coop, stia lavorando per implementare il welfare e l'uso consapevole e razionato degli antibiotici, nelle filiere carne di sua pertinenza.

Questi sforzi sono stati molto apprezzati dalla platea di consumatori intervistata durante l'indagine, che ha premiato Coop come insegna della GDO più attenta a questo genere di argomenti.

Da tenere in considerazione è inoltre che i consumatori sono stati intervistati prima che venisse conseguito un obiettivo particolarmente importante per Coop; infatti da Maggio 2021 tutti i suini destinati alla filiera Coop Origine non hanno subito il taglio della coda in scrofaia.

Questa pratica, sebbene concessa solo in deroga in Italia, sappiamo tutti che è ancora troppo diffusa e applicata sul territorio nazionale.

Infine, in un'ottica di sviluppo e di miglioramento continuo delle filiere animali, durante l'intervento nella giornata Sipas del 26/11/2021 è stata lodata l'implementazione di sistemi come il Classyfarm e il «Sistema di Qualità Nazionale per il benessere animale» (SQNBA), che risultano essere un importante elemento per valutare il punto di partenza di ogni allevatore e i passi avanti che vengono compiuti negli anni.

ANTIBIOTIC FREE NELL'ALLEVAMENTO SUINO ITALIANO: IL CONSUMATORE E RUOLO DELLA FILIERA

MONTRASI ALBERTO

Sempre più si sente parlare in tv e nei social media del problema legato all'utilizzo indiscriminato di antibiotici che verrebbe effettuato all'interno degli allevamenti intensivi. Mentre i mezzi di comunicazione presentano un problema importante,questo tipo di comunicazione tende a basarsi sul presupposto che il consumatore sia in grado di valutare in maniera critica e oggettiva questo flusso di informazioni molto tecniche : in realtà il consumatore ha spesso poco tempo e/o poco interesse ad approfondire informazioni tecniche complesse.
L'uso spesso frequente e improprio degli antibiotici,ad es. utilizzo a dosi sub-terapeutiche o senza rispettare i tempi previsti dalla terapia, fatto in passato per sopperire a carenze di naturale gestionale e strutturale negli allevamenti ha permesso la selezione di microrganismi potenzialmente in grado di determinare fenomeni di antimicrobico resistenza .
Dalla nostra prospettiva di grande distribuzione vicina al consumatore ,possiamo constatare che questi ultimi sono molto sensibilizzati rispetto all'utilizzo di antibiotici negli allevamenti animali,con un opinione che solitamente si associa a "pericolosità": si ritiene che il ricorso agli antibiotici per stimolare la crescita degli animali da allevamento sia pericoloso per la salute degli animali e dell'uomo. In aggiunta è presente la convinzione che prevalga un uso eccessivo ed inappropriato di antibiotici per non fare ammalare gli animali, che danneggia la salute dei consumatori.
Per la maggior parte dei consumatori quindi una delle cause principali di preoccupazione è rappresentata dai **residui ,di antibiotici o ormoni, e dai contaminanti che possono essere presenti nelle carni.**
Si teme quindi che i prodotti di origine animale in vendita possano contenere residui di sostanze , che possano quindi essere ingeriti dal consumatore.
Queste opinioni sull'uso di antibiotici negli allevamenti animali influenzano anche le scelte di consumo,con un interesse crescente per gli alimenti riportanti l'etichetta "senza-antibiotici" .
Però molti consumatori non sono al corrente che nei prodotti di origine animale adibiti al consumo umano vengono controllate le eventuali sostanze e i residui che potrebbero costituire un pericolo per la salute pubblica, come le sostanze ad effetto anabolizzante e quelle non autorizzate, i medicinali veterinari e gli agenti contaminanti.
A questo va aggiunto che già a partire dal 2006 la Comunità Europea è intervenuta andando a vietare l'utilizzo degli antibiotici come promotori di crescita, devono essere quindi autorizzati per soli scopi terapeutici.
Peraltro,nel corso del tempo l'utilizzo degli antibiotici è calato notevolmente,perché tutti i protagonisti delle attività produttive si sono resi conto della necessità di portare alla riduzione del consumo degli antibiotici e finalmente si è arrivati al concetto "One Health": l'antimicrobico resistenza deve essere approcciata considerando la stretta correlazione fra salute umana, salute animale ed ambiente.
Oggi vorrei quindi veicolare il concetto che la collaborazione fra i vari attori di questa filiera può portare a un miglioramento continuo in campo e nella comunicazione, che deve essere mirata verso un consumatore che può avere una conoscenza limitata e poco tempo scegliere.

LE FILIERE IN CARREFOUR

Carrefour lavoro al concetto di "Filiera" fin dal 1992, prima ad esempio della problematica emersa con la BSE.

Per Carrefour la Filiera non è solo una sequenza di operatori che producono e distribuiscono un prodotto.
Per Filiera intendiamo un progetto reale che prevede la stretta collaborazione di tutti gli interpreti della catena produttiva, partendo ovviamente da chi ha la responsabilità diretta in campo (allevatori ,agricoltori , veterinari) fino ad arrivare alla GDO e al consumatore
I prodotti di Filiera vengono realizzati andando a identificare caratteristiche produttive dei singoli paesi,soprattutto selezionando fornitori interessati all' obiettivo primario della filiera: un graduale miglioramento delle pratiche di benessere degli animali nelle loro condizioni di allevamento, un uso ragionato dei trattamenti antibiotici, e crucialmente un impegno costante nel garantire la salubrità dei prodotti per il consumatore
Tutto questo progetto viene garantito dalla sottoscrizione di specifici disciplinari di produzione e viene garantito dai numerosi controlli e analisi effettuati in ogni fase della produzione.

ASPETTI APPLICATIVI
Il punto cardine della gestione di un allevamento è quello di garantire il benessere dell'animale. Per definire il "benessere" dobbiamo necessariamente basarci sull'analisi dei tanti fattori connessi con le condizioni di vita dell'animale, il rispetto dei suoi fabbisogni e la sua capacità di adattamento all'ambiente.
Solo avendo chiaro questo aspetto di "multifattorialità" si può garantire una migliore sanità degli animali, con la conseguente riduzione degli interventi farmacologici

Misure adottate nella Filiera:

tutto parte da una gestione dell'allevamento che rientri all'interno di un sistema di autocontrollo,che presenti specifiche istruzioni operative, specifiche procedure per la gestione delle non conformità e soprattutto l'analisi dei dati così ottenuti per arrivare a un miglioramento continuo della Filiera
Pianificare, attuare, valutare e **migliorare**: sono i quattro passaggi che permettono di realizzare un metodo di gestione iterativo utilizzato per il controllo ed il miglioramento continuo dei processi e dei prodotti

Alcuni obiettivi da considerare nella filiera del suino:

- Monitoraggio e realizzazione di un progressivo piano di miglioramento per tutte quelle manifestazioni cliniche che traggono origine da situazioni di stress per l'animale: ferite,morsicature,lesioni agli arti e articolazioni fin dalla fase della nascita del suinetto;

- Metafilassi antimicrobica prescritta solo quando vi è una reale necessità di cure mediche. Non dovrebbe mai essere usata in sostituzione di buone prassi di gestione.

- La profilassi non deve essere adottata in modo sistematico, ma deve essere riservata in casi eccezionali

- Realizzare dei protocolli di gestione sanitaria degli allevamenti, da rivalutare a intervalli regolari prendendo spunto da quanto verificatosi in allevamento
- Privilegiare un sistema di produzione «tutto pieno, tutto vuoto», prevedendo la pulizia approfondita e la disinfezione delle unità di produzione quando gli animali arrivano e sono spostati all'interno e all'esterno dell'allevamento; cosa che avviene ad esempio in aziende a ciclo chiuso o in situazioni di approccio integrato fra aziende di riproduzione e di ingrasso.

- Potenziare le misure di biosicurezza impedendo l'ingresso dei patogeni in allevamento e applicare una strategia di vaccinazione, ove pertinente;
- Applicare un efficace piano di pest control e di pulizia / sanificazione

- Alimentazione: agli animali devono essere somministrati alimenti di qualità,con formulazioni studiate basate sullo stadio fisiologico degli animali. Gli alimenti devono essere controllati attraverso specifici piani analisi;

- Acqua: gli animali devono avere sempre a disposizione acqua. Deve essere controllata per verificarne la qualità;
- Perfetta funzionalità del sistema di ventilazione in modo da garantire la possibilità di modificare le condizioni se vi è un'elevata frequenza di malattie respiratorie ricorrenti o se le condizioni ambientali non sono buone (stress da caldo);

- Riesaminare la gestione dello svezzamento in casi di ricorrente diarrea: valutando in particolare l'igiene, l'età dei suini, l'uso di sistemi «tutto pieno, tutto vuoto», modi per ridurre lo stress degli animali e alternative all'uso profilattico di antimicrobici;

- Un antimicrobico a spettro limitato deve sempre essere la prima scelta, a meno che precedenti test di sensibilità - sostenuti se del caso da dati epidemiologici rilevanti - ne dimostrino l'inefficacia. L'uso di antimicrobici ad ampio spettro e di combinazioni di antimicrobici deve essere evitato (ad eccezione di combinazioni fisse contenute in medicinali veterinari autorizzati).

- Non utilizzare classi di antibiotici considerati di importanza critica in medicina umana (CIAs)

Diventa quindi sempre più necessario creare sistemi di produzione suina integrata che permettano di garantire una gestione capillare di tutte le fasi produttive,dal mangimificio all'allevamento .
La realizzazione del sistema ClassyFarm, sistema integrato finalizzato alla categorizzazione dell'allevamento in base al rischio, è una innovazione tutta italiana che riteniamo possa allinearsi con i principi di una Filiera della GDO, facilitando la collaborazione ed il dialogo tra tutti gli interpreti della realtà produttiva, aumentando così il livello di sicurezza e qualità dei prodotti della filiera agroalimentare.

COMUNICAZIONE
Punto fondamentale, ma molto spesso dimenticato o non considerato, è rappresentato dalla corretta comunicazione che deve essere predisposta per spiegare tutto il lavoro fatto a monte di un progetto di Filiera.
Il consumatore ha il potere di premiare o di affossare un prodotto a seconda di come viene presentato e soprattutto non tutti i consumatori interpretano la stessa informazione alla stessa maniera
Ecco perché deve essere realizzato un sistema semplice ma chiaro di etichettatura o di informazione che i consumatori riconoscano e capiscano
Un sistema di comunicazione chiara potrebbe essere rappresentato dal progetto del "Sistema di Qualità Nazionale per il Benessere Animale", il quale si basa sul sistema del Classyfarm a cui si assommano ulteriori requisiti di salute e di benessere animale superiori a quelli delle pertinenti norme europee e nazionali.

Tutto questo progetto avrà la garanzia di essere controllato e verificato da Enti di Certificazione accreditati

CONCLUSIONI

Il continuo miglioramento del livello di benessere animale in allevamento deve essere garantito e mantenuto non attraverso l'utilizzo indiscriminato dei trattamenti antimicrobici, ma mediante una riduzione dell'incidenza delle malattie e permettendo all'animale di massimizzare le proprie capacità di adattamento all'ambiente, riducendo i fattori stressanti per mezzo di efficaci programmi di gestione aziendale, di profilassi, di biosicurezza e di potenziamento delle strutture di allevamento

L'associazione fra la presenza del Veterinario Aziendale,Il sistema integrato Classyfarm ,le attivazioni della ricetta elettronica,il futuro obbligo dell'utilizzo del registro elettronico dei trattamenti e le linee guida predisposte per lo sviluppo delle Filiere della GDO rappresentano un sistema integrato molto promettente per monitorare e migliorare i livelli di benessere animale e di biosicurezza , individuando i punti critici sui quali intervenire, per promuovere un utilizzo più razionale dell'antimicrobico fino ad arrivare a una progressiva eliminazione

ATTI DEL XLVII MEETING ANNUALE

Lazise (VR), 9-10 Giugno 2022

PARTO LIBERO O GABBIA PARTO TEMPORANEA? PANORAMICA SU LEGISLAZIONE, APPLICAZIONE DELLE NORME E DECISIONI CHIAVE NELLA SCELTA DI UN'ALTERNATIVA ALLA GABBIA PARTO

BAXTER EMMA M.

Animal Behaviour and Welfare, Animal and Veterinary Sciences Group, Scotland's Rural College, West Mains Road, Edinburgh, EH9 3JG, UK

Correspondence: Emma.Baxter@sruc.ac.uk

INTRODUZIONE

Il settore dell'allevamento intensivo del suino continua ad essere caratterizzato dall'uso di gabbie parto convenzionali. Le gabbie parto hanno ben note conseguenze sul benessere, in particolare per la scrofa, poiché il confinamento stretto impedisce comportamenti di creazione del nido altamente motivati, interrompendo la modulazione ormonale del parto e aumentando lo stress (Lawrence et al., 1994; Yun et al., 2015; Baxter et al. , 2018). La riduzione del confinamento ha un impatto positivo per le scrofe ma anche per i suinetti, con un miglioramento del comportamento materno, della qualità del colostro e dell'accesso alla mammella (Pedersen et al., 2011; Yun et al., 2013, 2014). Sebbene esistano sistemi alternativi per il parto e l'allattamento, la loro applicazione è risultata limitata per diversi motivi, tra cui le preoccupazioni degli allevatori sul potenziale di sopravvivenza dei suinetti più piccoli, sulla facilità di gestione e sui costi. Tuttavia, la pressione per abolire tutti i sistemi di confinamento è in aumento. Il successo dell'iniziativa dei cittadini europei (ECI), "End the Cage Age", ha galvanizzato il dibattito sul futuro dei sistemi di confinamento. Ciò ha portato la Commissione europea a dichiarare che "entro la fine del 2023, avrebbe messo in atto una proposta legislativa per eliminare gradualmente e infine vietare tutti i sistemi di allevamento in gabbie", possibilmente già nel 2027. Ciò seguirebbe un adeguato periodo di transizione, dopo un una solida valutazione scientifica (o "controllo di idoneità") sulle attuali normative sul benessere animale (direttiva 98/58/CE del Consiglio).

Normative sulle gabbie parto, iniziative della produzione e dei consumatori

Norme che limitano l'uso delle gabbie parto sono in vigore in Svezia (dal 1987), Svizzera (dal 1997 con un periodo di transizione di 10 anni) e Norvegia (dal 2000). Nuova Zelanda, Austria e Germania hanno annunciato la graduale eliminazione delle gabbie parto entro il 2025, 2033 e 2036 rispettivamente. Al di fuori dell'Europa (a parte la Nuova Zelanda) non ci sono regolamenti che vietino l'uso delle gabbie, tuttavia negli Stati Uniti, la Proposition 12 (emanata in California nel 2018) evidenzia la tendenza a un maggiore dibattito tra le varie parti interessate sull'uso continuato dei sistemi di confinamento. Tuttavia si concentra solo sulle gabbie gestazione.

In Danimarca, gli allevatori hanno annunciato nel 2011 che entro il 2022 il 10% dei loro allevamenti avrà la fase di lattazione libera (Pig Research Centre, 2011). Nel Regno Unito non ci sono impegni specifici per abolire l'uso delle gabbie, tuttavia il 40% degli allevamenti da riproduzione è già a parto libero, essendo allo stato brado, e si discute sui sussidi governativi per pratiche di benessere più elevate che non utilizzano gabbie parto. I sussidi governativi sono stati proposti anche in altri paesi, come discusso in un recente Workshop su parto e lattazione liberi (FFL21, 2021). Esistono anche schemi di etichettatura

che si basano su un divieto di utilizzo di gabbie (ad es. RSPCA Assured, Soil Association) o consentono l'uso di gabbie per periodi di tempo limitati (ad es. Beter Leven, Danish 3 Hearts) (Heinola et al., 2021).

Quale sistema: parto libero o gabbie parto temporanee?

1. L'importanza della terminologia

L'uso della terminologia corretta è importante per la trasparenza nei confronti del consumatore e delle altre parti interessate (Wu et al., 2021), ma anche perché esistono differenze importanti nella progettazione e gestione di sistemi alternativi che influiscono sulle prestazioni e quindi influenzeranno la scelta degli allevatori. Il termine "parto libero", che dovrebbe indicare un confinamento pari a zero, è spesso usato per descrivere qualsiasi sistema alternativo alla gabbia parto convenzionale. Tuttavia, in molti casi, le scrofe sono effettivamente in gabbia e non possono girarsi liberamente durante il parto.
Il sistema alternativo più comune disponibile in commercio e in funzione nei paesi senza regolamenti sulle gabbie parto, è la gabbia parto temporanea/confinamento temporaneo. Tipicamente in questo sistema si mette in gabbia la scrofa fino a 3-7 giorni dopo il parto, dopodiché rimane libera per la lattazione. La ricerca sull'uso di gabbie parto temporanee è aumentata notevolmente negli ultimi 10-15 anni (Goumon et al., 2022) e la maggior parte delle ditte costruttrici offre gabbie temporanee/apribili come alternativa alla gabbia parto. Indipendentemente dal fatto che i sistemi parto siano veramente liberi (cioè nessuna gabbia o confinamento) o siano a confinamento temporaneo, c'è una grande variabilità riguardo le dimensioni (cioè m2 per posto di scrofa), nelle caratteristiche di progettazione e nella gestione. Ci sono box parto disegnati sulla scrofa e sulla nidiata, dove viene aggiunta la possibilità di chiudere la scrofa temporaneamente allo scopo di ridurre il rischio di schiacciamento dei suinetti neonatali. Altre gabbie temporanee hanno più somiglianze con le tradizionali gabbie parto, con innovazioni limitate al soddisfacimento delle esigenze comportamentali di scrofe e suinetti (per maggiori dettagli vedere Goumon et al., 2022). I veri box parto liberi variano anch'essi in termini di metratura e caratteristiche di progettazione, ma la maggior parte sono più grandi dei sistemi di gabbie o di gabbie temporanee per consentire la zonazione nel recinto (cioè aree diverse per svolgere funzioni diverse) per soddisfare i requisiti comportamentali delle scrofe, per evitare di riposare, mangiare, bere e defecare nello stesso luogo (Baxter et al., 2011).

2. Decisioni chiave

Il passaggio dalle gabbie parto convenzionali a qualsiasi alternativa implica prendere una serie di decisioni importanti. Molte di queste decisioni comporteranno compromessi tra le esigenze della scrofa, dei suoi suinetti, dell'allevatore e di altre parti interessate (ad es. consumatori) e altre esigenze esterne (ad es. obiettivi ambientali). Il processo decisionale è a più livelli. Se un allevatore sceglie di passare dalle gabbie parto a un sistema alternativo, deciderà prima di tutto se deve riadattare un edificio esistente o fare una nuova costruzione. È probabile che quest'ultima sia la scelta ottimale, in quanto lo spazio per posto scrofa (m2) dovrebbe aumentare dato che anche le gabbie convenzionali e l'ingombro minimo che occupano non sono più adatte per scrofe e nidiate di razze moderne iperprolifiche, essendo entrambe notevolmente più grandi di quando le gabbie parto sono state introdotte negli allevamenti (Moustsen et al., 2011; Nielsen et al., 2018). Contrariamente a una gabbia parto progettata in modo che la scrofa non possa girarsi, i box per il parto libero e per il confinamento temporaneo devono lasciare spazio alle

scrofe per girarsi. L'area necessaria dipende dalle dimensioni della scrofa e dal modo in cui si muovono dinamicamente. L'adeguamento di una stalla richiederà la riduzione delle dimensioni della mandria per facilitare il soddisfacimen to di questi requisiti di base ed è improbabile che sia una strategia economicamente vantaggiosa a lungo termine.

Una volta presa questa decisione iniziale, ci sono molteplici fattori di pianificazione e costruzione da considerare:

- Permessi
- Normative ambientali
- Costruzione per un confinamento temporaneo o per parto libero?
- Qual è lo spazio minimo per posto scrofa?
- Quanti box per sala parto (considerando routine di lavoro, spazio per infermeria, ventilazione)?
- Quale pavimento: solido, fessurato, parzialmente fessurato (considerando anche la progettazione per poter fornire materiali manipolabili)?
- Quali sono le emissioni (interagisce con la pavimentazione + il sistema di rimozione dei liquami/rifiuti)?
- Come gestire l'impianto (se in gabbia temporanea, quando/come chiudere e aprire, se parto libero, come intervenire in sicurezza)?
- Il sistema è a prova di futuro, il sistema scelto sarà socialmente accettabile?

Ci sono poi decisioni specifiche da prendere riguardo il tipo di sistema e le attrezzature e gli accessori al suo interno che possono avere un impatto sul benessere degli animali, sulle prestazioni, nonché sulle routine di gestione e sull'efficienza complessiva. Decidere lo spazio minimo è senza dubbio importante, ma la qualità dello spazio è altrettanto importante, compresi i dettagli del design che possono promuovere buoni comportamenti materni (Baxter et al. 2011), una buona igiene (Andersen et al., 2020) e facilitare routine di lavoro efficienti (Hansen, 2018; Heidinger et al., 2018). Ci sono poi varie considerazioni generali sull'esecuzione di più sistemi in un singolo allevamento (che può avere un impatto sulle prestazioni - King et al., 2019), oltre a considerare quale sia il genotipo ottimale per il sistema scelto.

Conclusioni e ricerche future

Questa presentazione sintetizza le basi per aiutare gli allevatori, le parti interessate del settore e i responsabili politici ad affrontare il processo di transizione dalle gabbie parto a box per un parto "libero" e fornire le decisioni e le scelte chiave necessarie.
L'efficienza del parto libero si basa sull'ottimizzazione delle "3 P" (pens, people, pigs). Sebbene siano state condotte molte ricerche sulla progettazione ottimale delle alternative alle gabbie parto, è stata prestata meno attenzione all'ottimizzazione della selezione dei suini e allo sviluppo di migliori pratiche per il personale di supporto. Questi aspetti dovrebbero essere mirati ad uno sforzo per combinare la ricerca base con le conoscenze che possono essere acquisite dai primi utilizzatori che diventano via via più esperti con sistemi di confinamento ridotti. Nonostante l'ampia ricerca sui diversi sistemi, rimane una mancanza di chiarezza su ciò che funziona e ciò che sarà conforme in futuro. C'è anche una mancanza di conoscenza sui potenziali benefici a lungo termine di sistemi di benessere più elevati per i suini (ad es. longevità della scrofa, crescita dei suinetti e stato di salute) e su come questi si traducano in benefici per gli altri stakeholder, compreso come ciò potrebbe avere un impatto sulla sostenibilità e sugli obiettivi di sicurezza alimentare (Buller et al., 2018).

BIBLIOGRAFIA

1. Andersen, H. M. L., Kongsted, A. G., and Jakobsen, M. (2020). Pig elimination behavior—A review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 222, 104888. doi:10.1016/j.applanim.2019.104888.
2. Baxter, E. M., Andersen, I. L., and Edwards, S. A. (2018). "Sow welfare in the farrowing crate and alternatives," in *Advances in Pig Welfare*, 27–71. doi:10.1016/B978-0-08-101012-9.00002-2.
3. Baxter, E. M., Lawrence, A. B., and Edwards, S. A. (2011). Alternative farrowing systems: Design criteria for farrowing systems based on the biological needs of sows and piglets. *Animal* 5, 580–600. doi:10.1017/S1751731110002272.
4. Buller, H., Blokhuis, H., Jensen, P., and Keeling, L. (2018). Towards farm animal welfare and sustainability. *Animals* 8, 81. doi:10.3390/ani8060081.
5. Goumon, S., Illmann, G., Moustsen, V. A., Baxter, E. M., and Edwards, S. A. (2022). Review of Temporary Crating of Farrowing and Lactating Sows. *Front. Vet. Sci.* 0, 169. doi:10.3389/FVETS.2022.811810.
6. Hansen, L. U. (2018). Test of 10 Different Farrowing Pens for Loose-Housed Sows. 1–34.
7. Heidinger, B., Stinglmayr, J., Maschat, K., Oberer, M., Kuchling, S., and Baumgartner, J. (2018). Summary of the Austrian Project "Pro-SAU": Evaluation of Novel Farrowing Systems with Possibility for the Sow to Move.
8. Heinola, K., Kauppinen, T., Niemi, J. K., Wallenius, E., and Raussi, S. (2021). Comparison of 12 Different Animal Welfare Labeling Schemes in the Pig Sector. *Anim. 2021, Vol. 11, Page 2430* 11, 2430. doi:10.3390/ANI11082430.
9. King, R. L., Baxter, E. M., Matheson, S. M., and Edwards, S. A. (2019). Consistency is key: Interactions of current and previous farrowing system on litter size and piglet mortality. *Animal* 13. doi:10.1017/S1751731118000927.
10. Lawrence, A. B., Petherick, J. C., McLean, K. A., Deans, L. A., Chirnside, J., Gaughan, A., et al. (1994). The effect of environment on behaviour, plasma cortisol and prolactin in parturient sows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 39, 313–330. doi:10.1016/0168-1591(94)90165-1.
11. Moustsen, V. A., Lahrmann, H. P., and D'Eath, R. B. (2011). Relationship between size and age of modern hyper-prolific crossbred sows. *Livest. Sci.* 141, 272–275. doi:10.1016/J.LIVSCI.2011.06.008.
12. Nielsen, S. E., Kristensen, A. R., and Moustsen, V. A. (2018). Litter size of Danish crossbred sows increased without changes in sow body dimensions over a thirteen year period. *Livest. Sci.* 209, 73–76. doi:10.1016/j.livsci.2018.01.015.
13. Pedersen, M. L., Moustsen, V. A., Nielsen, M. B. F., and Kristensen, A. R. (2011). Improved udder access prolongs duration of milk letdown and increases piglet weight gain. *Livest. Sci.* 140, 253–261. doi:10.1016/j.livsci.2011.04.001.
14. Pig Research Centre (2011). Action Plan Better animal welfare for pigs. Available at: https://en.fvm.dk/fileadmin/user_upload/FVM.dk/Dokumenter/Landbrug/Indsatser/Dyrevelfaerd_og_-transport/Svinehandlingsplan_engelsk_final.docx.
15. Wu, W., Zhang, A., van Klinken, R. D., Schrobback, P., and Muller, J. M. (2021). Consumer trust in food and the food system: A critical review. *Foods* 10. doi:10.3390/FOODS10102490.
16. Yun, J., Swan, K. M., Oliviero, C., Peltoniemi, O., and Valros, A. (2015). Effects of prepartum housing environment on abnormal behaviour, the farrowing process, and interactions with circulating oxytocin in sows. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 162, 20–25. doi:10.1016/J.APPLANIM.2014.11.006.

17. Yun, J., Swan, K. M., Vienola, K., Farmer, C., Oliviero, C., Peltoniemi, O., et al. (2013). Nest-building in sows: Effects of farrowing housing on hormonal modulation of maternal characteristics. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 148, 77–84. doi:10.1016/j.applanim.2013.07.010.
18. Yun, J., Swan, K. M., Vienola, K., Kim, Y. Y., Oliviero, C., Peltoniemi, O. A. T., et al. (2014). Farrowing environment has an impact on sow metabolic status and piglet colostrum intake in early lactation. *Livest. Sci.* 163, 120–125. doi:10.1016/j.livsci.2014.02.014.

PROGRAMMI ALIMENTARI PER SUINETTI DOPO LO SVEZZAMENTO SENZA L'UTILIZZO DI ANTIBIOTICI E ZNO

MOLIST FRANCESC

Schothorst Feed Research B.V., 8218 NA Lelystad, The Netherlands
Correspondence: FMolist@schothorst.nl

INTRODUZIONE

La crescente prolificità delle scrofe moderne ha portato ad un aumento della redditività per gli allevatori di suini, ma ha anche comportato complicazioni per quanto riguarda la gestione, la salute e il benessere degli animali. È ad esempio aumentato il numero di suinetti nati leggeri e di suinetti con ritardo della crescita intrauterina (IUGR), problemi che interessano oggi il 30-40% dei suinetti. La compromissione della funzione intestinale e immunitaria in combinazione con lo stress da svezzamento rende i suinetti appena svezzati estremamente vulnerabili alle patologie. Di conseguenza, all'interno della produzione di suini, la maggior parte degli antimicrobici viene utilizzata durante il post-svezzamento. I fattori di rischio per le malattie del post-svezzamento comprendono: età e peso allo svezzamento, scarsa assunzione di mangime durante il periodo immediatamente successivo allo svezzamento, eccesso di cibo (cioè grandi quantità di mangime in un basso numero di pasti), grandi quantità di nutrienti non digeriti che arrivano all'ileo e diversi fattori gestionali (ad es. igiene, temperatura, correnti d'aria, spazi di alimentazione). In passato, i nutrizionisti potevano "mascherare" le infezioni gastrointestinali utilizzando antibiotici nei mangimi, livelli farmaceutici di zinco (Zn) e/o alti livelli di rame (Cu) nelle diete dei suinetti. Tuttavia, in Europa non è più consentito l'utilizzo massivo di antibiotici nei mangimi dal 2006 e sono già in vigore (ulteriori) restrizioni rispetto a Cu e Zn nelle diete dei suinetti.

Interventi pre-svezzamento

I suinetti nella prima settimana di vita dovrebbero ricevere colostro e latte in quantità e di qualità sufficienti. A partire dalla seconda settimana di vita si raccomanda poi la somministrazione di mangime sottoscrofa (creep feed) ai suinetti. La transizione dietetica dal latte al mangime esclusivamente solido è uno dei fattori di stress più importanti allo svezzamento, che contribuisce al cosiddetto " post-weaning dip ", cioè ad una drastica caduta in termini di salute e performance dei suinetti. L'obiettivo della somministrazione di mangimi sottoscrofa **è** quello di migliorare le prestazioni dei suinetti dopo lo svezzamento, abituando i suinetti a mangimi solidi già prima dello svezzamento. Gli effetti del creep feed sullo sviluppo dell'intestino (e sul microbiota) dipendono anche dall'età di somministrazione, dalla composizione, dai nutrienti e dal livello di assunzione. Gli effetti della somministrazione di creep feed sulle prestazioni dei suinetti sono maggiori nei suinetti che lo consumano (i cosiddetti mangiatori) e in particolare in quelli che ne consumano quantità relativamente elevate. Anche la composizione del creep feed, soprattutto l'appetibilità, può influenzare l'assunzione di mangime e il numero di suinetti che mangiano. Inoltre, le diete pre-svezzamento non dovrebbero essere troppo ricche di nutrienti, poiché una dieta troppo ricca può comportare l'arrivo di una quantità eccessiva di substrato al piccolo intestino con conseguente crescita eccessiva di potenziali batteri patogeni e una sensazione prolungata di sazietà. Alcuni studi hanno dimostrato che dopo lo svezzamento, una minore energia nella dieta possa effettivamente stimolare l'assunzione di mangime, ma questo resta da confermare prima dello svezzamento.
Il successo di fornire mangime solido prima dello svezzamento nel migliorare le presta-

zioni post-svezzamento non dipende solo dal livello di assunzione e dalla composizione del creep feed e della dieta per svezzamento, ma dipende anche dalla loro somiglianza. Quando il mangime sottoscrofa è troppo diverso dalla dieta post-svezzamento, i suinetti potrebbero non adattarsi alla dieta post-svezzamento, anche se l'assunzione di mangime sottoscrofa prima dello svezzamento è stata elevata, come dimostrato da uno studio di Heo et al. (2018). In questo studio ai suinetti sottoscrofa **è stato** somministrato o un mangime sottoscrofa, o una dieta per svezzamento o una dieta per scrofe, mentre dopo lo svezzamento **è stata somministrata l**a dieta di svezzamento che alcune nidiate avevano già ricevuto prima dello svezzamento. Le nidiate alimentate con sottoscrofa prima dello svezzamento hanno avuto l'assunzione totale di mangime più alta prima dello svezzamento. Nelle prime due settimane dopo lo svezzamento, tuttavia, i suinetti che sono stati alimentati con la dieta di svezzamento prima e dopo lo svezzamento hanno avuto un'assunzione di mangime post-svezzamento maggiore rispetto agli altri due gruppi e un aumento di peso corporeo post-svezzamento maggiore rispetto al gruppo alimentato con sottoscrofa. È interessante notare che il gruppo con dieta per scrofe ha avuto un aumento di peso corporeo intermedio nelle prime due settimane dopo lo svezzamento e una migliore efficienza alimentare tra la settimana 2 e 5 dopo lo svezzamento rispetto agli altri due gruppi. Inoltre, questi risultati possono suggerire che la somiglianza tra la composizione della dieta pre e post-svezzamento è più importante per le prestazioni post-svezzamento rispetto al livello di assunzione di mangime prima dello svezzamento. Si ritiene quindi importante fornire la stessa dieta (almeno l'ultima settimana/giorni) prima dello svezzamento e nel periodo iniziale dopo lo svezzamento, affinché i suinetti riconoscano la dieta post-svezzamento non solo a livello comportamentale (ridurre la neofobia alimentare), ma anche fisiologico.

Interventi post-svezzamento

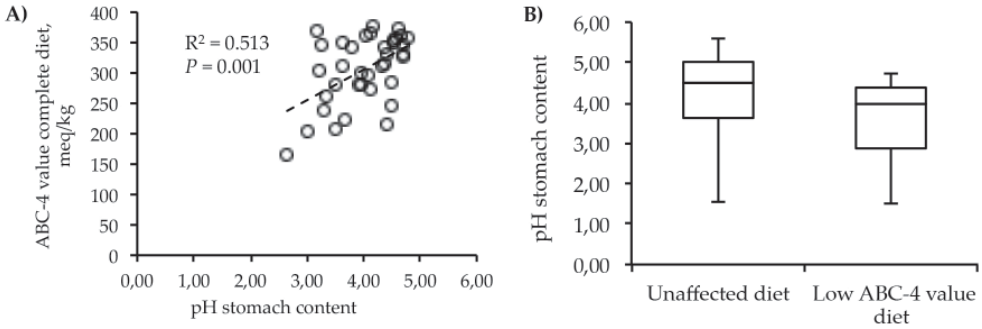
Immediatamente dopo lo svezzamento i suinetti sperimentano una anoressia a breve termine, con l'assunzione di energia che non viene ripristinata ai livelli pre-svezzamento fino a 2 settimane dopo lo svezzamento. La scarsa assunzione di mangime, insieme allo stress dello svezzamento, determina una ridotta funzionalità gastrica e di barriera, infiammazione intestinale e alterazioni istologiche dell'intestino tenue (es. atrofia dei villi), riducendo così l'attività degli enzimi. Questi cambiamenti fanno sì che l'integrità della mucosa intestinale dei suinetti sia compromessa, aumentando il rischio di infiammazione, provocando l'accumulo di nutrienti non digeriti nell'intestino crasso e la crescita eccessiva di batteri nocivi. Tutto questo ha come effetto quello di aumentare la sensibilità dei suinetti alle infezioni batteriche enteriche. È quindi importante favorire e stimolare l'assunzione di mangime nei suinetti appena svezzati (ad es. utilizzando una dieta di transizione o la stessa dieta del periodo pre-svezzamento). Per promuovere la salute intestinale dei suinetti svezzati, è stata studiata e rivista un'ampia gamma di interventi nutrizionali, in particolare sono stati testati diversi ingredienti funzionali e additivi per mangimi.

1. Funzionalità della barriera gastrica- ruolo di sali minerali e proteina grezza

La prima misura nutrizionale per mantenere sani i suinetti è controllare il pH dello stomaco per stabilire una buona barriera e funzionalità gastrica. La capacità dello stomaco di digerire efficacemente i nutrienti dipende dal pH e dalla velocità di svuotamento, dalla composizione della dieta, dalle dimensioni delle particelle alimentari e dalla quantità di secrezioni gastriche prodotte. I suinetti giovani, tuttavia, producono solo basse quantità di HCL, il pH dello stomaco è quindi elevato con una conseguente riduzione della digestione dei nutrienti. La ridotta ingestione insieme alla somministrazione di cibo in pochi pasti e quindi la relativamente elevata assunzione di mangime solido per pasto durante l'immediato periodo successivo allo svezzamento, può provocare un aumento e una variazione del pH dello stomaco dei suinetti appena svezzati. Un

pH elevato dello stomaco aumenta la quantità di proteine non digerite che entrano nel tratto intestinale, aumenta il rischio di diarrea post-svezzamento e può compromettere la funzione di barriera gastrica. È noto che la capacità tampone della dieta può modulare il pH gastrico (Fig. 1A) e la quantità di HCL necessaria per acidificare il contenuto dello stomaco.
La capacità tampone degli ingredienti dei mangimi può essere definita dalla cosiddetta capacità di legame degli acidi (ABC) ed è definita come la capacità di un ingrediente di resistere a una variazione del pH. Gli ingredienti con un alto valore ABC-4 (cioè la capacità di legare l'acido a pH 4) hanno un effetto più forte sulla neutralizzazione del pH nello stomaco rispetto agli ingredienti con un basso valore ABC-4 (Fig. 1B). Il valore ABC-4 di una dieta sembra dipendere dal contenuto di proteine grezze, dal contenuto di ceneri e dal contenuto di sali minerali. Tuttavia, sono coinvolte anche la capacità di ritenzione idrica, la pressione osmotica intrinseca e la dimensione delle particelle della dieta. Per migliorare la funzionalità dello stomaco l'ABC-4 della dieta dovrebbe essere di circa 250 meq/kg.

Figura 1. Correlazione tra il valore ABC-4 della dieta e il pH dello stomaco.



I dati in figura A mostrano la correlazione tra il valore ABC-4 di 31 diete sperimentali costituite da mangimi ricchi di proteine (6-8 suinetti/trattamento sperimentale) (2017-2019; Schothorst Feed Research, Lelystad, The Netherlands). Il valore ABC-4 è stato misurato in meq/kg utilizzando la metodologia descritta da Lawlor et al. [147]. Ogni punto rappresenta il pH medio dello stomaco per singola dieta. La figura B mostra l'effetto dell'acidificazione della dieta sul pH dello stomaco a livello individuale. Le diete in sperimentazione contenevano uno dei tre diversi mangimi ricchi in proteine note per il loro valore ABC-4: alto (cioè farina di pesce), intermedio (cioè farina di semi di soia hipro) e basso (cioè glutine di mais). I valori in figura B rappresentano il pH dello stomaco di tutti i mangimi ricchi di proteine insieme. Le diete a basso contenuto di ABC-4 sono state acidificate sostituendo il calcare in polvere con formiato di calcio (completamente o parzialmente) e l'aggiunta di acido citrico. Le altre diete non modificate non contenevano acidi organici. Il valore medio di ABC-4 della dieta non modificata era 308 mEq/kg (DS = 26) e 243 mEq/kg (DS = 95) per le diete a basso ABC-4. Il pH medio dello stomaco per la dieta non modificata era 4,22 (SD = 0,997), e 3,57 (DS = 1,075) per la dieta a basso contenuto di ABC-4.

Oltre a controllare il grado tampone della dieta è anche importante concentrarsi sul ruolo della proteina grezza (CP), delle fibre e dei grassi. Tradizionalmente, le diete per suinetti svezzati sono piuttosto ricche di energia e CP, per compensare la bassa assunzione di mangime durante la fase immediatamente successiva allo svezzamento. Tuttavia, livelli elevati di PG sono noti per essere uno dei principali fattori di rischio per la diarrea post-svezzamento nei suinetti

svezzati. Pertanto, i livelli di CP nelle diete dei suinetti dovrebbero essere ridotti almeno durante le prime 2 settimane dopo lo svezzamento. Le fonti di CP selezionate per le diete dei suinetti post-svezzamento devono essere facilmente digeribili, avere un impatto minimo sul pH dello stomaco (basso valore ABC-4) e la quantità di CP associata alla fibra dovrebbe essere limitata. Il contenuto di CP della dieta può essere ridotto bilanciando per limitare gli aminoacidi (AA) e per evitare carenze di AA. I suinetti hanno bisogno di AA per depositare le proteine e rinnovare il turnover delle proteine corporee. La lisina è il primo AA limitante per i suini alimentati con diete a base di cereali e la sua funzione principale è il mantenimento della sintesi proteica corporea. Tuttavia, anche altri AA (semi)essenziali possono essere utilizzati nelle diete post-svezzamento dei suinetti per il loro ruolo nel promuovere lo sviluppo e la salute intestinale (es. miglioramento della morfologia intestinale, aumento della proliferazione delle cellule epiteliali e mantenimento dell'integrità della mucosa intestinale), come per ad esempio glutammina, treonina e triptofano.

2. Ruolo della fibra alimentare

L'inclusione della fibra alimentare nelle diete post-svezzamento è un argomento controverso, poiché la fibra può ridurre l'assunzione di mangime e ridurre la digeribilità dei nutrienti, quindi può aumentare il rischio di proliferazione di batteri patogeni nel tratto gastrointestinale (GIT). Questi risultati così controversi sono in parte dovuti alla mancanza di informazioni sugli effetti funzionali della fibra alimentare, come la modifica delle caratteristiche fisico-chimiche del *digesta* o le caratteristiche di fermentazione dei diversi mangimi. Pertanto, è necessario valutare la fibra da un punto di vista funzionale, anziché da un punto di vista analitico. Dal punto di vista funzionale, la fibra alimentare può essere classificata in: fibra inerte (ICHO) - carboidrati non digeribili e non fermentabili nel GIT dei suinetti; e fibra fermentescibile (FCHO) - carboidrati che non vengono digeriti ma vengono fermentati nell'intestino crasso dei suinetti. Gli ingredienti principali generalmente utilizzati come fonti di ICHO sono crusca di frumento, bucce di avena, bucce di girasole e paglia di frumento. D'altra parte, le principali fonti di FCHO sono polpa di barbabietola da zucchero, bucce di soia, polpa di agrumi, polpa di cicoria e inulina.

Si ritiene che l'inclusione di fonti di fibre ricche di ICHO nelle diete post-svezzamento come strumento per diluire il livello di energia nella dieta aumenti l'assunzione di mangime e aumenti la velocità di passaggio del contenuto intestinale. Quest'ultimo, comporterà una riduzione della proliferazione di batteri patogeni nell'intestino tenue. Gerritsen et al., (2012) hanno dimostrato che quando una dieta standard per svezzati veniva diluita con l'aggiunta di 128 g di ICHO (50 g di paglia di frumento e 100 g di bucce di avena/kg di mangime), l'assunzione di mangime e l'ADG dei suinetti aumentavano tra i giorni 28 e 42 giorni di età rispetto ai suinetti alimentati con una dieta standard a base di cereali (cioè controllo negativo) o una dieta di controllo positivo ricca di sottoprodotti lattiero-caseari e aminoacidi cristallini (Tabella 1). Nello stesso esperimento, la dieta ICHO è stata associata ad un aumento del peso dello stomaco e dell'attività dell'amilasi negli enzimi del bordo del pennello nell'ileo. Inoltre, l'inclusione di ICHO ha comportato una minore conta di *E. coli* nell'ileo e nel colon digesto. Pertanto, si suggerisce che gli effetti fisiologici dell'inclusione di fonti di fibre ICHO nelle diete post-svezzamento sembrano essere correlati alla promozione dell'assunzione di mangime dei suinetti insieme a un migliore sviluppo del GIT. Sebbene l'inclusione di ICHO abbia aumentato l'assunzione di mangime dei suinetti, la diluizione delle diete con la fibra ICHO impedisce che i suinetti vengano sovralimentati con sostanze nutritive che non possono digerire, riducendo il rischio di proliferazione di batteri patogeni. Inoltre, alcune fonti di fibre inerti come crusca di frumento e paglia di frumento potrebbero ridurre l'adesione di *E. coli* ai recettori intestinali bloccandone l'adesione (Molist et al., 2017).

Tabella 1. Effetto della fonte di fibre alimentari sulle prestazioni dei suinetti tra 28 e 42 giorni di età (adattato da Gerritsen et al., 2012).

	Dieta [a]			SEM	P-value
	PC	NC	ICHO		
Assunzione media giornaliera di mangime (g/giorno)	280.8 [y]	284.1 [y]	328.1 [x]	6.82	0.001
Incremento medio giornaliero (g/giorno)	209.2	229.8	240.0	5.43	0.102
Rapporto di conversione del mangime	0.75 [x]	0.81 [y]	0.73 [x]	0.02	0.001
Attività dell'amilasi nel digiuno (mmol/g proteina)	0.030	0.028	0.032	0.001	0.060
Peso dello stomaco (% relativa al peso corporeo)	0.78 [y]	0.76 [y]	0.89 [x]	0.04	0.103
E. coli íleo (Log10/g)	5.6 [x]	4.8 [xy]	3.8 [y]	0.01	0.021
E. coli colon (Log 10/g)	6.8 [x]	5.6 [x]	3.9 [y]	0.42	0.002

Diversi apici (x,y) nella stessa riga indicavano una differenza significativa (P≤0,05).
A Diete: PC (controllo positivo), NC (controllo negativo), ICHO (dieta diluita con 50 g di paglia di grano e 100 g di bucce di avena/kg); (10 box con 6 suinetti per box per ogni trattamento).

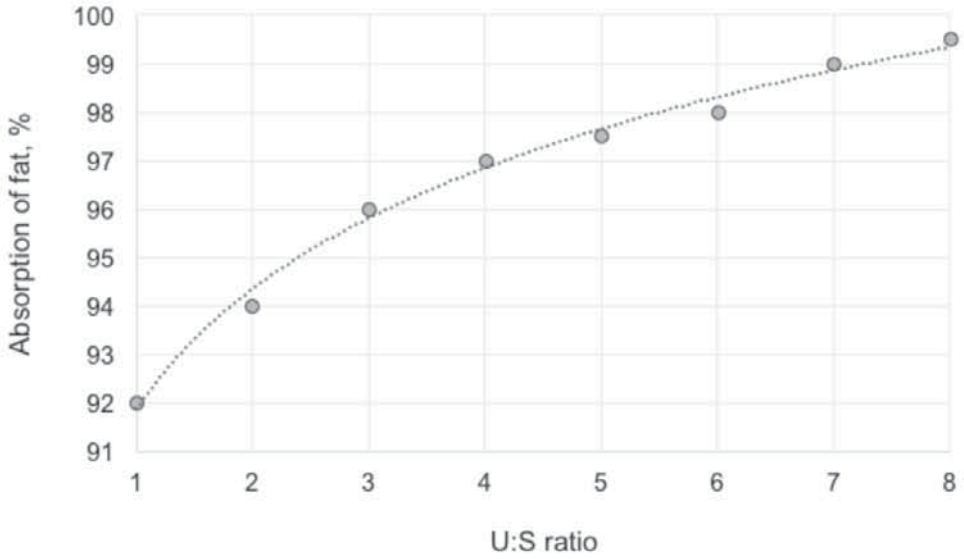
Le fonti di fibre fermentescibili (FCHO) stimolano la produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) nel GIT. Molist et al., (2009) hanno osservato un forte aumento della concentrazione di SCFA nel cieco dei suinetti alimentati con diete contenenti da 40 a 80 g di crusca di frumento o da 30 a 60 g di polpa di barbabietola da zucchero/kg di mangime rispetto ai suinetti alimentati con una dieta povera di fibre nel periodo dal 10° al 15° giorno dopo lo svezzamento. Tuttavia, va tenuto presente che la capacità fermentativa dei suinetti durante lo svezzamento potrebbe essere limitata e quindi l'inclusione di elevate quantità di FCHO (>100 g FCHO/kg) potrebbe provocare una disbiosi intestinale e di conseguenza diarrea. Si consiglia pertanto di aumentare i livelli di FCHO e di ridurre i livelli di ICHO nella dieta quando il suinetto è adattato al periodo successivo allo svezzamento e si è sviluppato il GIT. Per quanto riguarda la fibra alimentare si può concludere che intorno allo svezzamento è consigliabile includere nella dieta livelli moderati (da 50 a 80 g ICHO/kg) di fibra ICHO per: (1) diluire l'energia della dieta (a circa 2100 Kcal NE) ed evitare diarrea a causa della riduzione dell'accumulo di nutrienti non digeriti; e (2) aiutare i suinetti a ripristinare la loro funzione intestinale il più rapidamente possibile dopo lo svezzamento.

3. Ruolo dei grassi

Per quanto riguarda l'effetto delle diverse fonti di grasso o il livello di grasso nelle diete nel promuovere la salute intestinale dei suinetti, sono disponibili meno informazioni rispetto alla fibra alimentare o alla proteina. Tuttavia, alcuni studi hanno suggerito che l'uso di acidi grassi omega 3, ad esempio dall'olio di pesce, può avere un effetto benefico sulla salute intestinale, mentre altri studi non hanno riscontrato tale effetto (Li et al., 2014). Tuttavia, è importante notare che quando i suinetti hanno la diarrea, il primo nutriente che avrà una digestione alterata è il grasso. La proliferazione di batteri patogeni nel GIT comporterà la degradazione degli acidi biliari che si tradurrà in una minore digeribilità dei grassi. Per assicurare che i grassi utilizzati nella dieta siano ben digeriti è necessario tenere in considerazione il rapporto tra gli acidi grassi insaturi e gli acidi grassi saturi. Come mostrato nella Figura 2, questo rapporto dovrebbe essere compreso tra 3 e 4 per i suinetti. Inoltre, in condizioni di challenge, l'utilizzo di acidi grassi a catena lunga dovrebbe essere limitato, mentre l'inclusione di ingredienti

ricchi di acidi grassi a catena media come olio di cocco o olio di palmisti è consigliata, perché la digestione e l'assorbimento sono meno complessi e più veloci rispetto agli acidi grassi a catena lunga. Alcuni studi hanno suggerito che gli acidi grassi a catena media abbiano proprietà antimicrobiche principalmente nei confronti dei batteri Gram +.

Figura 2. Correlazione tra percentuale di acidi grassi insaturi: acidi grassi saturi (rapporto U:S) nella dieta e relativa percentuale di assorbimento (%) dei grassi nei suinetti post-svezzamento (Doppenberg. & van der Aar, 2010).



Implicazioni pratiche

- La composizione della dieta pre-svezzamento e post-svezzamento, così come la loro interazione, sembrano essere molto importanti nel loro potenziale di supportare la salute dell'intestino dei suinetti e le prestazioni durante lo svezzamento. È quindi fondamentale utilizzare un approccio strutturato per le strategie nutrizionali dai primi giorni dopo la nascita alle prime settimane dopo lo svezzamento per ridurre i problemi gastrointestinali dei suinetti e la morbilità, la mortalità e l'uso di antimicrobici.
- Nei primi giorni di vita, l'obiettivo della formulazione è aumentare la sopravvivenza dei suinetti, poi, nelle settimane successive alla nascita, l'obiettivo è stimolare lo sviluppo e la maturazione intestinale. Verso lo svezzamento, l›obiettivo è stimolare l›assunzione di mangime solido da parte dei suinetti per prepararli allo svezzamento e prevenire la carenza e l›eccesso di cibo e il conseguente calo della crescita post-svezzamento e la disbiosi gastrointestinale. Poiché lo svezzamento è molto stressante per i suinetti, le strategie nutrizionali dovrebbero innanzitutto mirare alla salute e alla funzionalità dell›intestino.
- Per avere successo dopo lo svezzamento è necessario concentrarsi su una buona funzionalità dello stomaco dei suinetti riducendo la capacità di legare gli acidi della dieta. Adeguare la proteina grezza, la fibra e il grasso alle esigenze dei suinetti. Supportare la salute intestinale dei suinetti dopo lo svezzamento riducendo il contenuto di proteine grezze includendo amminoacidi funzionali e ottimizzando i rapporti tra la fibra fermentescibile e quella inerte. Un buon inizio dopo lo svezzamento è un successo per le successive fasi di crescita.

SVEZZAMENTO SENZA OSSIDO DI ZINCO: LA PROSPETTIVA DANESE

SØRENSEN ULRICH KRISTINA

PhD, Product Manager, Vilomix

INTRODUZIONE

L'utilizzo di ossido di zinco (ZnO) a livello terapeutico è efficace contro i batteri gastrointestinali che spesso causano diarrea nei suinetti durante il periodo di transizione e post-svezzamento.

Tuttavia, da giugno 2022 l'UE imporrà il divieto all'uso di ZnO a dosi terapeutiche nelle diete per svezzamento. La decisione ha avviato un'intensa ricerca per una soluzione alternativa, e una delle prime soluzioni proposte è stata quella di modificare la formulazione dei mangimi. Tuttavia, con l'avvicinarsi della scadenza, sta diventando sempre più chiaro che non si possa trovare la soluzione in un singolo ingrediente o nella sola formulazione. Per avere successo nello svezzamento senza l'aiuto di ZnO è necessaria una soluzione multifattoriale in cui lo stato di salute, la gestione e l'igiene devono essere combinati con strategie alimentari e integrazioni in una soluzione completa.

Le esperienze pratiche nella produzione danese ne danno prova.

Criticità dello svezzamento

La brusca separazione dalla scrofa rappresenta un forte stress per i suinetti. Oltre a questo, lo svezzamento è un periodo critico, in cui i suinetti dovranno approcciarsi ad un nuovo schema alimentare, a un nuovo modo di bere, al rimescolamento con altri suinetti, allo stabilimento di una nuova gerarchia. A questo va associato il passaggio a un nuovo ambiente, e la transizione dal latte ad un mangime solido, a base vegetale, contenente proteine e carboidrati più complessi (Lalles et al., 2007; Pluske et al., 1997).

Lo svezzamento provoca spesso una condizione di anoressia, caratterizzata da una ridotta assunzione di mangime nei giorni immediatamente successivi allo svezzamento. Questo accade perché lo svezzamento avviene a 3-4 settimane quando il tratto gastrointestinale (GI) del suinetto è ancora in via di sviluppo e non ancora completamente funzionante.

È necessario un costante apporto di nutrienti per supportare lo sviluppo del tratto gastrointestinale. L'assunzione di mangime e quindi uno stomaco pieno sono importanti per mantenere la struttura dei villi e le cellule intestinali responsabili dei processi digestivi e di assorbimento (Burrin et al., 2000; Heo et al., 2013). Se questo non avviene, si avranno di conseguenza diarrea e crescita ridotta.

Come ampiamente descritto in letteratura, allo svezzamento si assiste ad una atrofia dei villi e a una iperplasia delle cripte. Più lunghi sono i villi, maggiore è la superficie di assorbimento. La funzione delle cripte è quella di produrre nuove cellule che migrano verso l'alto a formare i villi. Quando si verifica un'atrofia dei villi, le cripte tentano di aumentare la produzione di nuove cellule, e diventano più profonde. Questi cambiamenti strutturali riducono la superficie per la digestione e l'assorbimento dei nutrienti. I cambiamenti nella struttura intestinale sono più pronunciati quanto più precoce è lo svezzamento (Pluske et al., 1997; Hedemann et al., 2003; Heo et al., 2013; Hampson 1986).

I cambiamenti morfologici nell'intestino tenue dopo lo svezzamento sono anche associati ad un declino dell'attività enzimatica delle cellule intestinali (Pluske 1997). Gli enterociti rappresentano il 90-95% delle cellule epiteliali delle cripte e dei villi, e sono responsabili

della secrezione degli enzimi digestivi (Cheng e Leblond, 1974). L'atrofia dei villi può essere in parte responsabile della ridotta attività enzimatica (Hampson e Kidder, 1986). Tuttavia, anche la somministrazione più o meno precoce di mangime sottoscrofa, l'età del suinetto allo svezzamento, la quantità di mangime consumato e la composizione del mangime possono influenzare l'attività enzimatica nel piccolo intestino.
Dopo il periodo di anoressia con ridotta assunzione di mangime subito dopo lo svezzamento, il consumo di mangime inizia ad aumentare. In un intestino danneggiato, con una superficie ridotta per l'assorbimento, parte del mangime rimarrà non assorbita nell'intestino. Questo mangime non assorbito potrà fungere da substrato per batteri come *E. coli* e causare diarrea (Nabuurs et al., 1994). Inoltre, il mangime non assorbito può anche indurre una diarrea osmotica, che può aggravare la diarrea causata da *E. coli* (Hampson e Kidder, 1986).
Lo svezzamento e i numerosi cambiamenti che ne derivano hanno un effetto negativo anche sul sistema immunitario. Il suinetto non è più coperto dall'immunità passiva (Nabuurs, 1998; Pluske, 1993) e il suo sistema immunitario non è ancora completamente sviluppato e funzionante. Di conseguenza, non può rispondere adeguatamente a fattori esterni. Inoltre, non si è ancora stabilito un microbioma stabile. La composizione del microbioma riflette in gran parte la composizione del mangime e la presenza di mangime nell'intestino (Leser et al., 2000), quindi il passaggio dal latte di scrofa al mangime solido induce un riarrangiamento della comunità batterica e spesso causa disturbi gastrointestinali (Jensen, 1998). Quando questo si associa ai fattori di stress dello svezzamento, si presenta una situazione critica che spesso ha come conseguenza diarrea e crescita ridotta.

Perché un bando dello zinco ossido?
Lo ZnO utilizzato a fini terapeutici (fino a 2500 ppm) è un degno successore dei promotori della crescita, poiché migliora le prestazioni e la salute dei suinetti e, inoltre, riduce le infezioni da *E. coli* e, di conseguenza, la diarrea (Starke, 2014). Tuttavia, questo uso di ZnO è stato collegato alla resistenza microbica (Bednorz et al., 2013). Inoltre, il livello farmacologico supera di gran lunga il fabbisogno nutritivo dell'animale, il che significa che vengono escreti con le deiezioni grandi volumi di zinco che finiscono nel terreno, con un impatto negativo sulla biodiversità. Su questa base, l'uso dello zinco ossido a livelli farmacologici nei mangimi per suinetti sarà vietato nell'UE a partire da giugno 2022 (European Medicines Agency, 2016). Nella produzione suina danese è stato gradualmente eliminato dal 2000.

Lo svezzamento: un esercizio multi-disciplinare
La diarrea post-svezzamento è costosa per l'allevatore di suini e porta a un alto tasso di mortalità dei suinetti. Per questo la fase dello svezzamento merita molta attenzione. Sebbene lo ZnO farmacologico sia facilmente sostituibile con uno o più additivi funzionali per mangimi, l'effetto complessivo non è stabile (Rhouma et al., 2013). La soluzione sembra invece risiedere in una strategia molto più completa, che inizia con una valutazione approfondita della strategia di gestione, igiene, salute, strutture, mangimi e strategia alimentare. Nella produzione suina danese, le molteplici esperienze pratiche hanno fornito la prova che la strategia multidisciplinare, che considera tutti questi aspetti, è quella vincente quando si sospende l'uso dello ZnO nei mangimi per lo svezzamento dei suinetti (Weber et al., 2019).

Focus sul mangime
I mangimi e gli ingredienti dei mangimi hanno un'influenza primaria sulla produzione perché una composizione corretta che si adatta alle esigenze del singolo allevamento è fondamentale per le performance.
L'alimentazione è un atto di equilibrio. In altre parole, i componenti del mangime e la

loro digeribilità devono essere continuamente adattati al livello di produzione del suino. Un'alimentazione e una strategia di alimentazione improprie possono portare a perdite produttive e a squilibri come la diarrea. È disponibile un'ampia gamma di additivi per mangimi per contrastare l'impatto negativo della transizione allo svezzamento e supportare il suinetto (Rhouma et al., 2013).
I cambiamenti nel tratto gastrointestinale causati dallo svezzamento, come la ridotta area di assorbimento e la bassa capacità enzimatica, sono una grossa sfida per la scelta della composizione del mangime e la strategia alimentare.
Quando si parla di diarrea in fase di crescita e svezzamento nei suinetti, il contenuto di proteine grezze gioca un ruolo importante ed è il primo fattore da regolare per ridurre o evitare focolai di diarrea. È ben documentato in letteratura e dimostrato nella pratica che un livello più basso di proteine grezze nella dieta per lo svezzamento può ridurre la diarrea. Questo perché sono disponibili meno proteine non digerite per la fermentazione microbica (Bikker et al., 2007; Heo et al., 2008). Inoltre, è estremamente importante che al suinetto vengano offerte fonti proteiche di buona qualità e facilmente digeribili, poiché l'intestino del suinetto ha una ridotta tripsina disponibile per il processo digestivo e il tratto gastrointestinale ha una scarsa capacità di digerire le proteine grezze subito dopo lo svezzamento (Hedemann e Jensen, 2004). I componenti del mangime come la caseina, per la quale il suinetto ha già gli enzimi, e il concentrato proteico di soia vengono digeriti e assorbiti rapidamente e facilmente, mentre le fonti proteiche come frumento, farina di semi di soia e farina di semi di colza vengono digerite e assorbite più lentamente (Nørgaard, 2019).
Diversi allevatori di suini danesi che non utilizzano ZnO durante lo svezzamento preferiscono ingredienti come concentrato di proteine di patata, concentrato di proteine di soia, componenti del latte e farina di pesce per ottenere una buona performance (Poulsen e Weber, 2020). Inoltre, il plasma è una buona fonte di aminoacidi, poiché la digeribilità del plasma è incredibilmente alta e il profilo amminoacidico ottimale.
La maggior parte dei produttori di suini e mangimi danesi segue le raccomandazioni fornite dal Centro danese di ricerca sui suini, SEGES, direttamente o con adeguamenti ove necessario. La pratica ampiamente utilizzata comprende tre diverse diete nell'intervallo di peso 6-9 kg, 9-15 kg e 15-30 kg (Tybirk et al., 2021).
Per ridurre il rischio di diarrea quando lo ZnO non sarà più consentito nei mangimi, si raccomanda una serie diversa di raccomandazioni per un'alimentazione più "delicata", con un livello inferiore di proteine grezze. Dato che questa modifica potrebbe essere associata ad una minor crescita del suinetto, è possibile soddisfare il fabbisogno di amminoacidi aggiungendo una fonte proteica altamente concentrata come il plasma. Nella maggior parte dei casi, sarà sufficiente utilizzare la formulazione meno proteica nella prima fase e, possibilmente, nella seconda.
Il contenuto di calcio dovrebbe poi essere inferiore, poiché un'elevata concentrazione di carbonato di calcio aumenta il rischio di diarrea. I livelli di calcio devono essere bilanciati per diminuire il rischio di diarrea e massimizzare la mineralizzazione ossea (Tybirk et al., 2021). È importante ricordare che un suinetto con diarrea può assumere poco Ca a causa della ridotta assunzione di mangime. Per questo motivo, se il suinetto assume una corretta quantità di alimento, si può considerare di mantenere un livello più basso di Ca nel mangime.
L'assunzione di mangime è di grande importanza per il successo dello svezzamento. I suini che hanno una buona e continua assunzione di mangime subiscono molti meno cambiamenti intestinali. Esiste una correlazione positiva diretta tra l'altezza dei villi intestinali e l'insorgenza di diarrea (Spreeuwenberg, 2002). Per preparare il suinetto al passaggio dal latte al mangime solido, è importante introdurre mangime solido (creep feed) nel box parto. Questa strategia abitua il maiale a un'alternativa al latte e stimola la prima produzione di

enzimi (Partridge, 1989). Inoltre, l'assunzione di mangime aumenta se i pasti sono più volte al giorno con quantità minori di mangime. Un apporto uniforme di alimento all'intestino garantisce l'apporto di nutrienti efficacie per mantenere la morfologia intestinale.

L'approccio multi-fattoriale

Un approccio unilaterale alla sfida dello svezzamento della diarrea riduce significativamente il tasso di successo. Il mangime, gli ingredienti del mangime e la strategia alimentare sono di grande importanza per la crescita e il benessere del suinetto e il rischio di diarrea (Rhouma et al., 2017) durante lo svezzamento senza l'uso di ZnO. Ma l'alimento da solo non può risolvere il problema.

Uno studio sugli allevatori danesi che svezzano suini senza ZnO mostra che è necessaria un intervento su più fronti. In particolare, un elevato livello di igiene e la garanzia di ingestione di mangime e acqua (Weber et al., 2019). È poi fondamentale che ogni allevatore abbia una strategia chiara di disinfezione e igiene e di gestione che ottimizzi la salute dell'allevamento. La gestione deve considerare l'età allo svezzamento, una strategia per mescolare i suinetti e una strategia di alimentazione, in cui la composizione e l'assunzione sono particolarmente importanti. Il mangime può essere ottimizzato secondo tutti i migliori principi, ma se i suinetti non lo mangiano, non ci saranno effetti positivi sulla crescita, né supporto alla maturazione della funzione gastrointestinale. Un'ottima alimentazione deve essere associata a molte altre considerazioni affinché il suinetto possa raggiungere il suo pieno potenziale.

CONCLUSIONI

Lo svezzamento induce grandi cambiamenti biologici al suinetto, con conseguenze a breve e lungo termine per la sua crescita e la sua salute. Il mangime è il principale fattore chiave per la crescita dei suinetti e deve essere adattato a ciascuna fase dello sviluppo del suinetto. Tuttavia, è fondamentale che gli allevatori seguano una chiara strategia di gestione, igiene, salute e nutrizione per ridurre al minimo gli effetti dello stress da svezzamento ed evitare la diarrea. Seguendo una strategia multidisciplinare di svezzamento, è possibile allevare suini in modo più produttivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bednorz C, Oelgeschläger K, Kinnemann B, Hartmann S, Pieper R, Bethe A, Semmler T, Tedin K, Schierack P, Wieler LH and Gunther S, 2013. The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. International Journal of Medical Microbiology, 303: 396-403.
2. Bikker P, Dirkzwager A, Fledderus J, Trevisi P, Huëderon-Luron II, Lallés JP and Awari A, 2007. Dietary protein and fermentable carbohydrates contents influence growth performance and intestinal characteristics in newly weaned pigs. Livestock Science, 108: 194-197.
3. Burrin DG, Stoll B, van Goudoever JB, Reeds PJ, 2000. Nutrient requirement for intestinal growth and metabolism in the developing pig. In: The Digestive Physiology of Pigs, Proceedings of the 8th symposium. Edited by JE Lindberg and B Ogle. CAB International, Wallingford.
4. Cheng H and Leblond CP, 1974. Origin, differentiation and renewal of the our main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. American Journal of Anatomy, 141: 461-479.
5. European Medicines Agency, 2016. European Medicines Agency - News and Events -Committee for Medicinal Products for Veterinary use (CVMP) meeting

6–8De-cember 2016. Retrieved on 04 March 2020 from http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/news_and_events/news/2016/12/news_detail_002661.jsp&mid=WC0b01ac058004d5c1

6. Hampson DJ, 1986. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. Research in Veterinary Science, 40:32-40.
7. Hampson DJ and Kidder DE, 1986. Influences of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the small intestine. Research in Veterinary Science, 40: 24-31.
8. Heo J, Kim J, Hansen CF, Mulan BP, Hampson DJ and Pluske JR, 2008. Effects of feeding low protein diets to piglets on plasma urea nitrogen, faecal ammonia nitrogen, the incidence of diarrhoea and performance after weaning. Archives of Animal Nutrition, 62: 343-358
9. Heo JM, Opapeju FO, Pluske JR, Kim JC, Hampson DJ and Nyachoti CM, 2013. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 97, 207-237.
10. Hedemann MS, Højsgaard S and Jensen BB, 2003. Small intestinal morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 87: 32-41
11. Hedemann MS and Jensen BB, 2004. Variations in enzyme activity in stomach and pancreatic tissue and digesta in piglets around weaning. Archives of animal Nutrition, 58(1):47-59.
12. Jensen BB, 1998. The impact of additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. Journal of Animal and Feed Sciences, 61: 293-304.
13. Lalles JP, Bosi P, Smidt H, Stokes CR, 2007. Weaning – A challenge to gut physiologists. Livestock Science, 108, 82–93.
14. Larsen C, Lynegaard JC, Pedersen AØ, Kjeldsen NJ, Hansen CF, Nielsen JP and Amdi C, 2021. A reduced CP level without medicinal zinc oxide does not alter the intestinal morphology in weaned pigs 24 days post-weaning. Animal, 15.
15. Leser TD, Lindecrona RH, Jensen TK, Jensen BB and Møller C, 2000. Changes in bacterial community structure in the colon of pigs fed different experimental diets and after infection with *Brachyspira hyodysenteriae*. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3290-3296.
16. Nabuurs MJ, Hoogendoorn A and Van Zijdrveld FG, 1994. Effects of weaning and enterotoxigenic *Escherichia coli* on net absorption in the small intestine of pigs. Research in Veterinary Science, 56:379-385.
17. Nabuurs MJ, 1998. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhoea. Veterinary Quarterly, 20: supplement 3, S42-S45.
18. Nørgaard JV, 2019. Hvordan fordøjes foderet i takt med, at grisen vokser? Conference presentation
19. Partridge IG, 1989. Alternative feeding strategies for weaner pigs. In: Barnett JL and Hennesy DP (editors), Manipulating Pig production II, proceedings of the Biennial Conference of the Australian Pig Science Association, Albury, 160-169.
20. Pluske JR, Hampson DJ and 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.
21. Poulsen J and Weber N, 2020. Hvilke råvarer bruger besætninger, der producerer smågrise uden brug af medicinsk zink? Erfaring nr. 2002. SEGES, Danish Pig Research Centre.

22. Rhouma M., Fairbrother, J. M, Beaudry, F., Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. Acta Veterinaria Scandinavia, 59, 31.
23. Starke IC, Pieper R, Vahjen W and Zentek J, 2014. The impact of dietary zinc oxide on the bacterial diversity of the small intestinal microbiota of weaned piglets. Veterinary Science and Technology, 5: 171-177.
24. Spreeuwenberg M, 2002. Diet composition and gut integrity in weaned pigs. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
25. Tybirk P, Sloth NM, Kjeldsen N and Weber N, 2021. Danish Nutrient Standards. SEGES, Danish Pig Research Centre.
26. Weber N, Poulsen J, Sørensen T and Bækbo, P, 2019. Fravænning uden zink - Erfaringer fra 26 smågrisebesætninger. Erfaring nr. 1912. SEGES, Danish Pig Research Centre.
27. Weber N, Sørensen T and Bækbo, P, 2019. Fravænning uden zink – erfaringer fra praksis. Erfaring nr. 1905. SEGES, Danish Pig Research Centre.

DEMEDICALIZZAZIONE DA OSSIDO DI ZINCO: UN PROBLEMA O UN'OPPORTUNITÀ?

PRIMA PARTE

CONTE FABRIZIO

Responsabile formulazione Gruppo Martini SpA

Dal 25 giugno 2022 non sarà più possibile utilizzare l'**ossido di Zinco,** come premiscela medicata, per il controllo della diarrea da svezzamento dei suinetti ai dosaggi correnti da 1500-3100 ppm.
Comprensibilmente, dopo sedici anni di relativa tranquillità, il settore suinicolo è in fermento e ampia è la discussione su eventuali "sostituti" che possano garantire un effetto equivalente in termini di "prevenzione" dello sviluppo di infezioni in particolare da E. Coli nella delicatissima fase svezzamento/post-svezzamento.
Proviamo però ad inquadrare questo provvedimento legislativo (G.U. 14/11/2017 n. 266) in una prospettiva storica di più ampio respiro che riguarda la graduale eliminazione dei promotori di crescita per ragioni di sanità pubblica (residui nelle carni e nei prodotti di origine animale e antibiotico resistenza) e di inquinamento ambientale:

> **si definiscono AGP** (antibiotici promotori della crescita) "*Sostanze diverse dai nutrienti che aumentano il tasso di crescita e l'efficienza della conversione dei mangimi in animali in buona salute alimentati con diete equilibrate. La loro efficacia è basata sull'effetto antibatterico e sulla capacità di influenzare e modificare parzialmente la composizione e la concentrazione complessiva della flora intestinale"*

Negli anni 70 erano ammessi nel mangime per suinetti (fino a 6 mesi di età) **come promotori di crescita antibiotici** che oggi ci sembrerebbero incredibili:

Tetraciclina
Clortetraciclina
Ossitetraciclina;
Pennicillina G
Zincobacitracina
Spiramicina
} 20ppm

(G.U della C.E. n. 270 del 23/11/1970; Direttiva 70/524 CEE)

Dal 1997 inizia un lento ma progressivo processo di eliminazione dell'utilizzo degli AGP

1997 Avoparcina
1999 (gennaio) Carbadox e Olaquindox (Reg. CE. n. 2788/98)
1999 (luglio) Spiramicina, Tilosina, Virginiamicina, Zincobacitracina (Reg. CE n.2821/98)

Fino al **2006: STOP tutti gli AUXINICI** (Reg. CE n.1831/2003)

Anche allora sembrava che non fosse più possibile allevare suini senza rischiare gravissime perdite, e invece…

Grazie a imponenti campagne di sensibilizzazione nei riguardi dei residui di antibiotici nelle carni, dei rischi connessi alle potenziali creazioni di antibiotico-resistenze e del rischio ambientale, unito ad uno sforzo di informazione e formazione da parte di associazioni e produttori di tutta la filiera suinicola, dopo un breve (ma intenso) periodo in cui sono aumentati

i trattamenti "terapeutici" a base antibiotica, piano piano le modalità di allevamento sono cambiate in meglio.
Le situazioni igienico-sanitarie degli allevamenti sono migliorate, la qualità degli alimenti e i piani alimentari sono stati via via sempre più differenziati in base alle diverse fasi di crescita degli animali, e ci si è orientati verso l'utilizzo di probiotici, prebiotici, enzimi e di minerali (Zn e Cu).
Certo l'Ossido di Zinco in dosi molto elevate si era dimostrato un ottimo alleato nel contrastare le infezioni da *E. Coli* (ETEC, EPEC) soprattutto nel periodo post svezzamento, anche se ancora oggi non sono chiari tutti i meccanismi con cui questo prodotto agisce a livello intestinale.
Tra i molti effetti positivi attribuiti alla somministrazione di Ossido di Zinco ricordiamo: riduzione delle diarree, maggiore assunzione di alimento, aumento di peso, migliore indice di conversione; a livello intestinale: influenza positiva diretta e indiretta sull'epitelio della mucosa intestinale, aumento delle cellule muco secernenti, azione fisica di barriera per impedire l'adesione dei batteri patogeni (*E.Coli*) alla parete intestinale, ottimizzazione del microbiota, effetto di immuno- modulazione,…
Sembra evidente che, a parte una diretta attività antibatterica che lo avrebbe relegato nell'ambito degli antibiotici, la maggior parte degli effetti attribuiti all'Ossido di zinco erano, e sono, direttamente legati alla *"buona salute"* dell'apparato digerente.

A questo punto l'opportunità sarà proprio quella di focalizzare l'attenzione sul concetto di *"buona salute"* che per i suinetti si potrebbe risolvere nell'allevare in modo "fisiologico" rispettando i tempi dei cambiamenti dell'apparato digerente e accompagnando le fasi di adattamento degli animali, che da un'alimentazione lattea dovranno passare ad una solida per poi sostenere una carriera produttiva che, nel caso specifico italiano, porterà alla produzione di suini pesanti con un peso alla macellazione intorno ai 160/170 kg. e almeno 9 mesi di età.

La presenza di ceppi di *E.Coli* enterotossici e/o enteropatogeni è necessaria allo sviluppo della PWD ma non sufficiente; infatti, la loro pericolosità è strettamente legata alla possibilità di superare le difese naturali dell'apparato digerente, di moltiplicarsi nel lume intestinale e di esplicare gli effetti patogeni. La Diarrea da Svezzamento dei suinetti è una patologia multifattoriale per la quale si riconoscono fattori predisponenti, fattori determinanti e fattori intensificanti

Rhouma et al, 2017, (parzialmente modificato)

Il contrasto più efficace si realizzerà quindi riducendo al minimo i fattori predisponenti e intensificanti, come lo svezzamento precoce, il rimescolamento delle nidiate, l'eccessiva densità dei suinetti, la scarsa attenzione ad episodi di digiuno/anoressia, oltre che l'utilizzo di mangimi non adeguati.
Il compito del nutrizionista sarà facilitare lo sviluppo fisiologico dell'apparato digerente dei suinetti nelle settimane più critiche (dalla 3° alla 7°) soprattutto per quello che riguarda i cambiamenti del pH gastro-intestinale, le modalità di digestione delle proteine e degli amidi e la creazione di un sano microbiota intestinale.
In sintesi si dovrà porre estrema attenzione ai corretti apporti proteici ed energetici oltre che alla qualità e quantità della fibra; alla qualità e valorizzazione delle materie prime utilizzate per la formulazione dei mangimi senza scordare l'importanza dell'acqua di abbeverata sia in termini di qualità che di quantità.

Lo stomaco del suinetto

Una caratteristica fondamentale dell'ambiente gastrico del suino adulto è il pH acido (2,5-4) che ha funzione protettiva nei confronti delle infezioni batteriche agendo come batteriostatico e/o battericida nei confronti dei ceppi patogeni enterotossici o enteropatogeni di *E. coli*, mentre favorisce la moltiplicazione dei ceppi di lattobacilli che andranno a rinforzare il microbiota intestinale. In effetti normalmente nello stomaco e nel primo tratto di duodeno si rilevano basse concentrazioni batteriche (10^3- 10^5 batteri/ml) rispetto al contenuto intestinale delle porzioni ileali dove la popolazione batterica è molto diversificata e numericamente più ricca (10^8 batteri/ml) (Pluske 2009; Luppi 2017).
Nei suinetti appena nati la produzione di HCl, anche se pare inizi subito dopo la nascita, si sviluppa lentamente e infatti il pH gastrico dei suinetti è considerato normale intorno a 6,5-5 con una prevalenza assoluta di acido lattico in conseguenza dell'alimentazione lattea. Anche se dopo i pasti il pH tende ad abbassarsi, i valori non sono stabili e risalgono abbastanza velocemente.
In questo ambiente, oltre a mancare la protezione nei confronti delle contaminazioni batteriche, non possono funzionare gli enzimi proteolitici, che si attivano solo in ambiente acido (pepsinogeno-pepsina), e quindi parte delle proteine fornite con gli alimenti potrebbero passare tal quali nell'intestino dando origine a pericolosi fenomeni di fermentazione con produzione di ammoniaca, indolo, scatolo, fenoli, amine, acidi grassi ramificati e composti solforati che a loro volta porterebbero ad un aumento del pH intestinale. La conseguenza sarebbe l'alterazione del microbiota intestinale con proliferazione batteriche incontrollate e diarree dei suinetti potenzialmente fatali.

A questo proposito vorrei ricordare che nello stomaco l'ossido di zinco si dissocia esplicando una azione tampone nei confronti dell'ambiente acido (così faticosamente raggiunto dai suinetti) costringendoci ad utilizzare acidificanti per compensare l'abbassamento del pH gastrico e questa potrebbe essere una riflessione ulteriore per ripensarne l'utilizzo soprattutto in un'ottica di *"buona salute"*.

Il MANGIME

Nella progettazione dei mangimi da svezzamento si dovrà partire dalla valutazione delle granulometrie degli ingredienti macinati e dalle dimensioni dei pellet, perché anche questi fattori influiscono in modo interessante sulla capacità digestiva e sulla salute dell'apparato digerente del suinetto a partire proprio dalla stimolazione della produzione di HCl nella zona del *fundus* gastrico per arrivare a condizionare, seppur in modo indiretto, la composizione del microbiota che notoriamente può essere influenzato in meglio o in peggio dalla qualità

dell'alimento fornito agli animali (Vukmirovi´c Đ, 2017)
Generalmente nei mangimi da svezzamento dovremmo avere una macinatura grossolana compresa tra 0.5 e 1.6 mm per poter esplicare al meglio le influenze positive sull'apparato gastrointestinale e cioè: la stimolazione della produzione di HCl nello stomaco, e un ridotto tempo di transito del contenuto intestinale che, se da una parte può ridurre i processi di assorbimento, dall'altra impedisce fermentazioni indesiderate. (Vukmirovi´c Đ, 2017; Morel PCH, 2007; Wondra JK, 1995; Healy BJ, 1994)
Anche la dimensione del pellet è importante (Clark A.B., 2015) in quanto si è visto che i suinetti sembrano apprezzare la masticazione, che per riflesso a sua volta stimola la produzione di succhi gastrici acidi. I pellet delle prove documentate in letteratura (Clark A.B., 2015; Craig et al., 2021) sono di tipo "soft" (materiale trattato a vapore prima della pellettatura). Questi due fattori (stimolazione dei succhi gastrici e consumo alimentare) sono molto importanti per la salute e il buon sviluppo dell'apparato digerente e inoltre sono fondamentali nel momento dello svezzamento per ridurre i rischi di anoressia/digiuno

Per quanto riguarda la formulazione dei mangimi, grande attenzione verrà posta nella scelta delle materie prime da utilizzare in modo che, pur dovendo fornire un basso tenore proteico, non vi siano mai carenze di AA essenziali; la scelta dei cereali sia orientata alla migliore digeribilità associata a un basso effetto di viscosità nell'intestino e le quote di fibre solubili e insolubili possano compensare i loro effetti favorendo la salubrità del microbiota agendo sul meccanismo fame/sazietà.

I grassi saranno ridotti perché in questa fase l'obiettivo primario non è fornire energia, ma stimolare lo sviluppo dell'apparato digerente quindi, se non si stimola il centro della sazietà, sarà più facile spingere i suinetti ad assumere il mangime e ridurre sempre più i rischi legati alle possibili fasi di anoressia/digiuno tipiche della fase di svezzamento.
L'integrazione lipidica dovrà essere concentrata sull'impiego di fonti ad elevata digeribilità di origine vegetale (cocco, soia) ed animale in particolare da pesce apportatore di Ω-3 per sostenere il sistema immunitario.

Il <u>tenore proteico</u> dei mangimi da offrire ai suinetti dovrà essere per forza basso (mancata attivazione del pepsinogeno in pepsina) e possibilmente basato su fonti proteiche ad elevata digeribilità, che garantiscano la presenza di tutti gli A.A. essenziali e dovranno essere prive di fattori anti-nutrizionali.
La scelta dovrebbe cadere per lo più su fonti proteiche di origine animale ad elevata digeribilità: in particolare i derivati del latte (WPC) e il plasma suino che oltre a fornire un adeguato apporto di AA essenziali, si sono dimostrati utili per la riduzione di fenomeni infiammatori e per stimolare l'immunità locale (Adewole D. et al., 2016; Pérez-Bosque A. et al., 2016), e le farine di pesce.
Si suggerisce comunque di utilizzare queste farine proteiche trattate a bassa temperatura (LT) per ridurre la formazione di amine biogene come prodotti di degradazione.
Anche le proteine di origine vegetale (concentrati di soia, di pisello, di patate) e le proteine funzionali (lieviti idrolizzati fonte di piccoli peptidi e aminoacidi liberi) si possono utilizzare, naturalmente se in forma altamente digeribile, prive di fattori anti-nutrizionali e debitamente integrate con gli AA essenziali mancanti

<u>Gli amidi</u> (elementi completamente nuovi per l'apparato digerente dei lattonzoli) per essere digeriti hanno bisogno di enzimi specifici che si sviluppano con il tempo.
Le fonti di amido, quindi, dovranno essere preferibilmente pretrattate al calore (precotte,

espanse, estruse) e i cereali scelti saranno sicuramente di elevata qualità, privi di contaminazione da micotossine (a cui i suinetti sono sensibilissimi).
I trattamenti termici però dovranno ancora una volta essere calibrati e i parametri di tempo/temperatura/pressione attentamente valutati, in quanto se da una parte il calore favorisce la digeribilità degli amidi, l'eccesso di calore ne aumenta la viscosità, in quanto provoca la gelificazione degli amidi con conseguente aumento della capacità di ritenzione di acqua, che a livello intestinale causa rallentamento del transito e alterazione del microbiota.
Normalmente i cereali più utilizzati sono frumento, orzo e avena.
Per quanto riguarda il mais anche se la sua viscosità non aumenta con le alte temperature (anzi pare diminuisca) la sua scarsa digeribilità ne sconsiglia l'utilizzo nei mangimi da svezzamento.

La fibra dovrà essere valutata con attenzione equilibrando gli effetti positivi e negativi delle frazioni solubili ed insolubili in modo da regolare la viscosità e velocità di transito del contenuto intestinale.
La parte insolubile in acqua non viene idrolizzata da enzimi endogeni, ma solo dalla flora batterica intestinale del cieco e del colon, ha quindi un'importante azione meccanica di regolazione dell'attività peristaltica ed è utilissima per compensare la viscosità dei cereali (orzo, frumento) ristabilendo la velocità di transito intestinale riducendo la possibilità di adesione agli enterociti dei batteri patogeni.
La fibra solubile (Pectine, Oligosaccaridi, β- glucani, Inulina) è di difficile utilizzo perché se da una parte risulta facilmente fermentescibile nel primo tratto intestinale e quindi in grado di favorire la moltiplicazione di Lattobacilli e Bifido-batteri implementando così il microbiota intestinale, dall'altra ha una alta viscosità che rallenta l'intestino. (Agyekum A.K., Nyachoti C.M., 2017)
Certamente l'ideale sarebbe preferire la fibra insolubile nelle prime due settimane di svezzamento mentre si può introdurre anche fibra solubile in quelle successive quando si sia superato il momento critico del post-svezzamento. In pratica è difficile suggerire valori di fibra solubile e insolubile: dipende dalle materie prime che si utilizzano, dalla loro corretta valorizzazione e dai trattamenti a cui vengono sottoposte.

BIBLIOGRAFIA

1. Adewole DI, Kim IH, Nyachoti CM. (2016), *Gut health of pigs: challenge models and response criteria with a critical analysis of the effectiveness of selected feed additives—a review.* Asian Australas J Anim Sci.; 29:909–24.
2. Agyekum A.K., Nyachoti C. M., (2017) *Nutritional and Metabolic Consequences of Feeding High-Fibe Diets to Swine: A Review*. Research Animal Nutrition and Feed Science; 3: 716-725.
3. Clark, A. B., J. A. De Jong, J. M. DeRouchey, M. D. Tokach, S. S. Dritz, R. D. Goodband, and J. C. Woodworth. (2015). *Effects of creep feed pellet diameter on suckling and nursery pig performance.* Kansas Agric Exp Station Res Rep. 8:13.
4. Craig, J.R., Kim, J.C., Brewster, C.J., Smits, R.J., Braden, C. and Pluske, J.R. (2021) *Increasing creep pellet size improves creep feed disappearance of gilt and sow progeny in lactation and enhances pig production after weaning.* Journal of Swine Health and Production, 29 (1). pp. 10-18.
5. Healy BJ, Hancock JD, Kennedy GA, Bramel-Cox PJ, Behnke KC, Hines RH. (1994) *Optimum particle size of corn and hard and soft sorghum for nursery pigs.* J Anim Sci. (1994) 72:2227–36.
6. Luppi A,(2017) *Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance.* Porcine Health Management; 3: 16.

7. Menegat, M. B., R. D. Goodband, J. M. DeRouchey, M. D. Tokach, J. C. Woodworth, and S. S. Dritz. (2019) *Kansas state university swine nutrition guide: fiber in nursery diets*. (2019).
8. Morel PCH, Cottam YH. (2007) *Effects of particle size of barley on intestinal morphology, growth performance and nutrient digestibility in pigs*. J Anim Sci. (2007) 20:1738–45.
9. Pérez-Bosque A, Polo J, Torrallardona D. (2016) Spray dried plasma as an alternative to antibiotics in piglet feeds, mode of action and biosafety. Porc. Health Manag.;2:1–10.
10. Pluske JR, Pethick DW, Hopwood DE, Hampson DJ. (2002) *Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs.* Nutr Res Rev. 2002; 15:333–71.
11. Rhouma M., Fairbrother J.M., Beaudry F., Letellier A.; (2017), *Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies*. Acta Vet Scand 59:31
12. Vukmirovi´c Đ, ˇcolovi´c R, Rakita S, Brlek T, Đuragi´c O, Solà-Oriol D. (2017) *Importance of feed structure (particle size) and feed form (mash vs. pellets) in pig nutrition* – A review. Anim Feed Sci Technol. (2017) 233:133–44.
13. Wondra KJ, Hancock JD, Behnke KC, Stark CR. (1995) *Effects of mill type and particle size uniformity on growth performance, nutrient digestibility, and stomach morphology in finishing pigs2*. J Anim Sci. (1995) 73:2564–73.

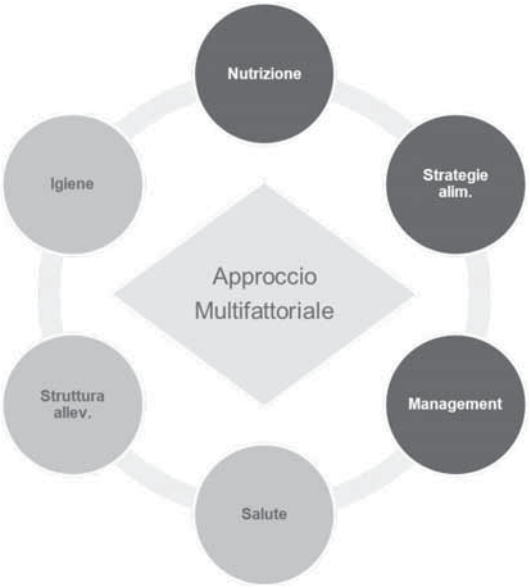
DEMEDICALIZZAZIONE DA OSSIDO DI ZINCO: UN PROBLEMA O UN'OPPORTUNITÀ?

SECONDA PARTE

VINCENZI RICCARDO

Nutritionist Veronesi - A.I.A., Verona

Nella prima parte sono stati approfonditi in modo particolare gli aspetti relativi ai macronutrienti del mangime con l'obiettivo di fornire utili indicazioni per la formulazione di una mangime "*safe*", in grado di aumentare il grado di resilienza del suinetto per superare efficacemente il periodo critico del post-svezzamento.
L'esperienza quotidiana "*sul campo*" dimostra ampiamente che non esiste il cosiddetto "*Golden/ Silver bullet*", cioè la soluzione univoca in grado di rimpiazzare lo ZnO e che essa non può essere individuata in un unico ingrediente, additivo od applicazione di allevamento.
Tale soluzione presuppone altresì un approccio "*olistico*", ovvero un'azione che sfrutta i punti di forza di differenti discipline (multifattoriale) come riportato nella fig. 1:



E' in tale ambito che, sinergicamente alle strategie nutrizionali approfondite nella prima parte, trova spazio e rilevanza tecnica l'impiego di supplementi appartenenti alla ampia categoria degli **Additivi.**
Ad essa appartengono, come da definizione, le "*sostanze, microrganismi o preparati, diversi dai mangimi e dalle premiscele che sono intenzionalmente aggiunti agli alimenti per animali o all'acqua al fine di svolgere, in particolare, una o più funzioni specifiche*. Secondo la classificazione di legge si distinguono in 5 categorie:

- *Tecnologici*: ogni sostanza aggiunta ai mangimi per scopi tecnologici
- *Organolettici*: ogni sostanza la cui aggiunta ai mangimi migliora o cambia le proprietà organolettiche dei mangimi o le caratteristiche visive degli alimenti derivati da animali;

- *Nutrizionali*;
- *Zootecnici*: ogni additivo utilizzato per influire positivamente sui parametri produttivi degli animali in buona salute o per influire positivamente sull'ambiente;
- *Coccidiostatici e Istomonostatici*;

E' con molta probabilità la categoria di sostanze più frequentemente invocata dagli operatori del settore zootecnico, talora con pretese miracolistiche, come soluzione al problema della demedicalizzazione da ossido di zinco, come già avvenuto in passato in occasione del bando dei fattori di crescita e degli AGP.

In effetti un contributo nel contenimento delle forme enteriche in post- svezzamento può derivare dall'impiego di prodotti singoli od associati, opportunamente integrati nelle diete e/o attraverso l'acqua di bevanda, quali:

- Acidificanti: la ridotta produzione di HCl a livello gastrico nelle prime fasi dopo lo svezzamento limita, come già ricordato, l'attività degli enzimi proteolitici aumentando il rischio di transito di proteina indigerita nell'intestino, "*pabulum*" elettivo per l'insorgenza di processi fermentativi anomali. Per tale motivo diventa prioritario controllare il pH gastrico attraverso una corretta gestione del potere tampone della dieta, strettamente correlato alla "*acid binding capacity*"(ABC) dei singoli componenti. Una dieta ad elevato potere tampone si oppone maggiormente alla acidificazione del tratto gastrico limitandone la capacità digestiva. Oltre ad una oculata selezione delle materie prime a bassa ABC, risultano efficaci per lo stessa finalità, diverse forme di acidi organici in gradi di ridurre il pH del mangime e dello stomaco aumentando la digeribilità proteica. (Peadar G. Lawlor, P. Brendan Lynch, Patrick J. Caffrey, James J. O'Reilly & M. Karen O'Connell 2005). Un buon criterio di valutazione dell'efficacia di un acido è rappresentato dal valore di pKa, definito come capacità o "*forza*" di dissociazione, ossia il valore di pH a cui il 50% dell'acido è dissociato in catione ed anione. Acidi "*forti*" quali l'acido formico, citrico e fumarico hanno valori di pKa ridotti ed esplicano la loro azione prevalentemente nel tratto gastrico determinando una adeguata acidificazione. Per contro acidi "deboli" con valori di pKa più elevati possono by-passare lo stomaco in forma indissociata (es. lattico, benzoico, acetico), svolgendo la loro attività a livello intestinale. Per lo stesso motivo risulta particolarmente interessante l'impiego di acidi organici in forma protetta con diverse modalità di rivestimento (coating), in grado di resistere all'attacco dei succhi gastrici e inducendo un lento rilascio nel tratto intestinale. Di notevole importanza sono gli acidi grassi a corta catena (SCFA da 1 a 4 atomi di C): è noto, in particolare, l'effetto di apporto energetico e trofico rigenerativo svolto dal butirrato sulle cellule intestinali (Galfi e Neogrady 1991 et al., Lu et al. 2008)e a media catena (MCFA) con attività preminente sui Gram+. In tale contesto merita un riferimento particolare l'acido laurico (C12) , efficace contro i Gram + come ad es. *Streptococcus Suis*. D'altra parte la forma libera di C12 non è particolarmente attiva, poiché viene in larga parte assorbita dall'intestino. Di qui l'impiego di esteri con il glicerolo, pH indipendenti ed efficaci nel tratto intestinale.
- Aminoacidi (AA): sono componenti primari nella costruzione delle proteine corporee. Come è noto gli animali hanno la capacità di sintetizzare solo alcuni AA (non essenziali), gli altri (essenziali) devono essere forniti esogenamente. E' necessario che gli AA siano correttamente bilanciati per soddisfare pienamente i fabbisogni nutrizionali ed ottimizzare le prestazioni produttive. Per tale motivo assume un rilievo fondamentale l'applicazione del concetto di "*proteina ideale*", basato in senso più stretto sulla digeribilità ileale standardizzata (SID) dei vari aminoacidi rapportati alla lisina, reso ancora più importante in un regime di dieta a basso tenore proteico. Un esempio di profilo ideale è riportato qui sotto:

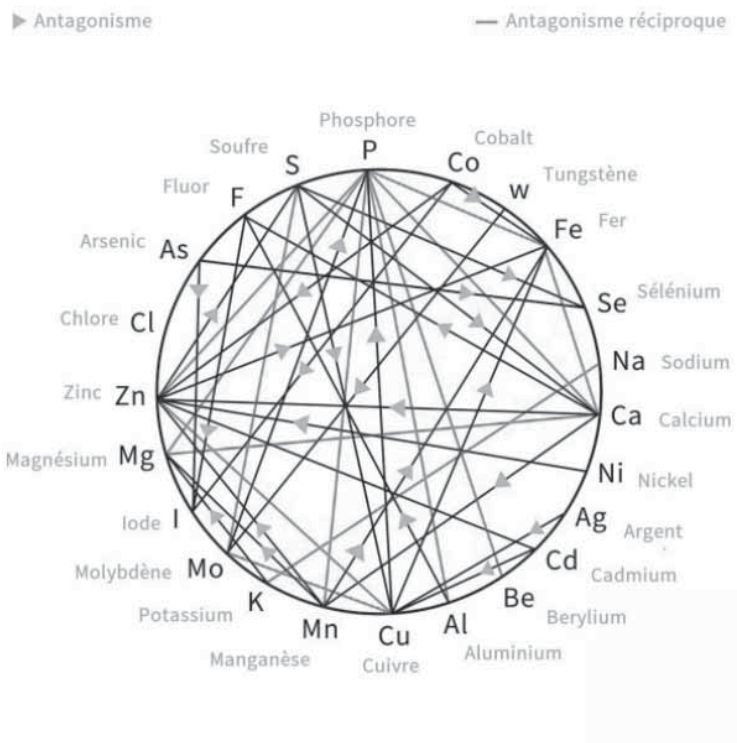
Piglets	SID values
Lys	100
Thr/Lys	65
Met/Lys	30
TSAA/Lys	60
Trp/Lys	22
Val/Lys	70
Ile/Lys	53
Leu/Lys	100
His/Lys	32
Phe/Lys	55
(Phe+Tyr)/Lys	95

(da Ajinomoto Eurolysine, 2013)

E' inoltre consolidato che in condizioni sanitarie non ottimali (challenging conditions) i rapporti aminoacidici (AA) aumentano per effetto della spesa metabolica sostenuta dal suinetto ammalato. (Lucas A Rodrigues,Michael O Wellington,J Caroline González-Vega,John K Htoo,Andrew G Van Kessel, Daniel A Columbus 2021)
In aggiunta ai tradizionali AA un importante ausilio deriva dalla recente disponibilità di nuovi AA quali (Istidina, Leucina ed Isoleucina). Altri saranno messi a punto nei prossimi anni contribuendo efficacemente al corretto bilanciamento della dieta ed alla riduzione del tenore proteico in un regime di maggiore sicurezza.
E' noto infatti che un livello proteico non oculatamente ridotto può avere un effetto negativo sulle prestazioni produttive e ciò può essere causato dalla carenza di alcuni AA semi-essenziali.

- Antiossidanti ed antinfiammatori: le condizioni ambientali di allevamento e gli stessi fattori alimentari possono innescare fenomeni di stress ossidativo con formazione di radicali liberi nell'organismo degli animali, specialmente di giovane età, con effetti negativi sul metabolismo cellulare e sulla risposta immunitaria. Per limitare tali rischi sono largamente utilizzati molteplici prodotti di varia natura e con diversi meccanismi di azione. Alcuni estratti da piante, in particolare, sono concentrati in Oli essenziali, (timolo, carvacrolo, eugenolo, etc.) e composti polifenolici, come ad es. i Flavonoidi (rappresentati da Flavoni, Isoflavoni, Antocianine, etc.) con effetto antinfiammatorio ed antiossidante, coinvolti nella inibizione della sintesi e della attività di diversi mediatori pro- infiammatori (es. citochine) (Faith A. Omonijo,Liju Ni,Gong J.,Qi Wang,Lahaye L.,and Chengbo Yang 2018)
  Alla stessa gruppo dei polifenoli appartengono i Tannini, composti ampiamente presenti nel Regno vegetale con funzione protettiva delle piante da patogeni e stress. Sono noti gli estratti da castagno (*Castanea Sativa*) e Quebracho (*Schinopsis spp.*), ricchi rispettivamente in Tannini idrolizzabili e condensati. (Caprarulo V.,Hejna M.,Giromini C.,Liu Y.,Dell'Anno M.,Sotira S.,Reggi S.,Sgoifo-Rossi C.A.,Callegari M.L.,Rossi L. 2020) (Hansuo Liu, Jiangxu Hu, Shad Mahfuz, and Xiangshu Piao 2020).
  Possono svolgere una efficace attività di regolazione del transito intestinale, modulando il microbiota intestinale e creando una barriera alla colonizzazione dei patogeni ed ai processi infiammatori.

- o Prebiotici e Probiotici: è scientificamente dimostrato che le strategie nutrizionali possono indurre la colonizzazione del tratto intestinale e la resistenza competitiva contro m.o. patogeni (es. E. Coli), migliorando le performance dei suinetti. Su questo presupposto è basato l'impiego di prodotti quali i:
- Prebiotici: sono composti non sottoposti a digestione enzimatica nella parte superiore del tratto gastroenterico e arrivano immodificate all'intestino cieco. Qui diventano il substrato nutritivo dei microrganismi intestinali attraverso un processo di fermentazione, promuovendo la crescita, nel colon, di una o più specie batteriche utili allo sviluppo della microflora probiotica. (Yujun Wu,Xiangyu Zhang,Dandan Han,Hao Ye,Shiyu Tao,Yu Pi,Junying Zhao,Lijun Chen,Junjun Wang 2020)
  Sono sostanze contenute in natura in alcuni alimenti, tra cui i polisaccaridi non amidacei o beta-glucani, i Frutto-oligosaccaridi (FOS), tra cui l'inulina, e i Galatto-oligosaccaridi (GOS)
- Probiotici: sono microrganismi (soprattutto batteri) viventi e attivi, in grado di esercitare un effetto positivo sulla salute dell'organismo, rafforzando in particolare l'ecosistema intestinale. Di particolare interesse zootecnico sono i Lieviti (es. Saccharomyces), i Lattobacilli ed i ceppi batterici sporigeni (es. Bacillus Subtilis e Licheniformis). (Gaggìa F.,Mattarelli P., Biavati B. 2010) (Kangli Wang,* Guangyong Chen,* Guangtian Cao,† Yinglei Xu,* Yongxia Wang,*and Caimei Yang*,2019)
- o Minerali: particolare attenzione deve essere posta alla corretta integrazione minerale di macro- e micro-elementi. Essi sono coinvolti in complessi processi metabolici ed interagiscono tra di loro determinando rapporti specifici di sinergismo o di antagonismo.



Con particolare riferimento ai micro-eIementi è necessario ricordare l'importanza del rame, Manganese, Zinco e Ferro. I suinetti, come è noto, sono soggetti ad una carenza di Ferro, in particolare nei primi stadi di vita. Una attenta valutazione deve essere fatta nel periodo del post-svezzamento, selezionando le forme chimiche più biodisponibili in grado di aumentare l'assorbimento di questi elementi. A tale riguardo l'impiego di forme organiche (chelate), nelle diverse forme disponibili, trova largo riscontro nell'alimentazione dei giovani animali.

- Acqua: un approfondimento particolare deve essere dedicata alla qualità e alla quantità di acqua di abbeverata, considerata nella sezione precedente. Essa rappresenta a tutti gli effetti un alimento primario ed insostituibile, spesso trascurato o non adeguatamente valutato in allevamento.

  Le qualità dell'acqua di bevanda è definita da vari parametri tra cui la salinità, il pH, la durezza, la presenza di sostanze indesiderabili e contaminanti, la temperatura, fattori che influenzano in modo significativo la quantità di acqua e di mangime consumati, le produzioni e la salute degli animali. (Madie R. Wensley et all, 2021 Patience, J. F., A. D. Beaulieu, and D. A. Gillis. 2004).

  L'impiego dell'acqua di bevanda come veicolo per l'apporto di integrazioni vitaminiche ed antibiotiche, nonché per la supplementazione di acidificanti è una pratica sempre più diffusa in allevamento.

  Per tale motivo è fondamentale conoscere a priori le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti utilizzati, spesso in associazione multipla e la loro compatibilità per evitare interazioni indesiderate.

  La progettazione dell'allevamento non deve prescindere dalla corretta collocazione, dal numero degli abbeveratoi e dalla portata dell'acqua nell'impianto. Sono fattori che possono incidere fortemente sulla comparsa di fenomeni di aggressività e di competizione con risvolti negativi sulle performances (Jackson, C. J. 2007).

  Altro aspetto da non trascurare infine è la manutenzione periodica dell'impianto di abbeverata con specifici prodotti in grado di rimuovere il biofilm all'interno delle tubazioni, riducendo efficacemente i rischi di contaminazioni fungine e di sostanze tossiche.

BIBLIOGRAFIA

1 Bonetti A., Tugnoli B., Piva A. and Grilli E. *Towards Zero Zinc Oxide: Feeding Strategies to Manage Post-Weaning Diarrhea in Piglets* Animals 2021, 11, 642. https://doi.org/10.3390/ani11030642.

2 Caprarulo V.,Hejna M.,Giromini C.,Liu Y,Dell'Anno M.,Sotira S.,Reggi S.,Sgoifo-Rossi C.A.,Callegari M.L.,and Rossi L. *Evaluation of Dietary Administration of Chestnut and Quebracho Tannins on Growth, Serum Metabolites and Fecal Parameters of Weaned Piglets* Animals 2020, 10, 1945.

3 Gaggìa F.,Mattarelli P., Biavati B. 2010 *Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production International* Journal of Food Microbiology Volume 141, Supplement, 31 July 2010, Pages S15-S28.

4 Galfi P., Neogrady S. (1996), *Short Chain Fatty Acids (Acidifiers) as Probiotics in diets for Piglets* 4th International Feed Production Conference Piacenza.

5 Hayakawa T.,Masuda T.,Kurosawa D.,Tsukahara T. *Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets* Anim. Sc. Journal 2016 1501-1510.

6 Jackson, C. J. 2007 *Drinking behavior in nursery aged pigs [master's thesis]* Ames, IA: Iowa State University. doi:10.31274.rtd-180813-15847

7 Kangli Wang,Guangyong Chen,Guangtian Cao,Yinglei Xu,Yongxia Wang,Caimei Yang,2019 *Effects of Clostridium butyricum and Enterococcus faecalis on growth performance, intestinal structure,and inflammation in lipopolysaccharide-challenged weaned piglets* Journal of Animal Science, 2019, 4140–4151.
8 Liu H., Hu J., Mahfuz S., and Piao X. *Effects of Hydrolysable Tannins as Zinc Oxide Substitutes on Antioxidant Status, Immune Function, Intestinal Morphology, and Digestive Enzyme Activities in Weaned Piglets* Animals (Basel). 2020 May; 10(5): 757.
9 Lu J.J. ,Zou X.T.,and Wang Y.M. (2008), *Effects of sodium butyrate on the growth performance, intestinal microfl ora and morphology of weanling pigs.* Journal of Animal and Feed Sciences, 17, 2008, 568–578.
10 Luise D.,Bosi P.,Raff L.,Amatucci L.,Virdis S. and Trevisi P. *Bacillus spp. Probiotic Strains as a Potential Tool for Limiting the Use of Antibiotics, and Improving the Growth and Health of Pigs and Chickens* Front. Microbiol., 07 February 2022.
11 Ma C., Azad MAK, Tang W., Zhu Q., Wang W., Gao Q., Kong X. *Maternal probiotics supplementation improves immune and antioxidant function in suckling piglets via modifying gut microbiota.* J Appl Microbiol. 2022 Apr 9. doi: 10.1111/jam.15572. Epub ahead of print. PMID: 35396768.
12 Omonijo F.A., Ni L., Gong J., Wang Q., Lahaye L, Yang C. *Essential oils as alternatives to antibiotics in swine production* Anim Nutr.2018 Jun; 4(2): 126–136.
13 Patience J. F., A. D. Beaulieu, and D. A. Gillis. 2004. *The impact of ground water high in sulfates on the growth performance, nutrient utilization, and tissue mineral levels of pigs housed under commercial conditions.* J. Swine. Health. Prod. 12:228–236.
14 Peadar G.,Lawlor P.,Lynch B., Caffrey P.J.,O'Reilly J.J. & O'Connell M.K. *Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets* Irish Veterinary Journal volume 58, Article number: 447 (2005).
15 Rodrigues L.A.,Wellington M.,González-Vega J.C.,K Htoo J.,G Van Kessel A.,Columbus D.A.(2021) *Functional amino acid supplementation, regardless of dietary protein content, improves growth performance and immune status of weaned pigs challenged with Salmonella Typhimurium* Journal of Anim. Sciences Feb 1;99(2):skaa365. doi: 10.1093/jas/skaa365.
16 Rossi R.,Pastorelli G.,Cannata S., C. Corino 2010 *Recent advances in the use of fatty acids as supplements in pig diets:* A review Animal Feed Science and Technology Volume 162, Issues 1–2,25 November 2010, Pages 1-11.
17 Wensley M.R. et all, 2021 *Maintaining continuity of nutrient intake after weaning. II. Review of post-weaning strategies* Transl. Anim. Sci. 2021.5:1-16 doi: 10.1093/tas/txab022
18 Wu Y.,Zhang X.,Han D.,Ye H.,Tao S.,Pi Y.,Zhao J.,Chen L.,Wang J. *Short Administration of Combined Prebiotics Improved Microbial Colonization, Gut Barrier, and Growth Performance of Neonatal Piglets* ACS Omega 2020, 5, 32, 20506–20516.

LO SCORING POLMONARE AL MACELLO NELLA REALTÀ DEL SUINO PESANTE ITALIANO.

DOTTORI MICHELE

IZSLER

Lo scoring polmonare al macello suinicolo è un attività che vede la luce in Europa negli anni 60 e che è stata già applicata, seppur sporadicamente in Italia, negli anni 80 ad opera del dr Pier Filippo Guadagnini.
E' però alla fine degli anni 90 che IZSLER organizza un servizio di monitoraggio delle patologie respiratorie in sede di macellazione e al giorno d'oggi questa attività è diventata patrimonio di vari professionisti. Come è noto si possono compiere rilievi anche sulle patologie di altri settori anatomici, ma il monitoraggio più utile riguarda le forme respiratorie e secondariamente le ascaridiosi attraverso l'evidenza delle lesioni in sede epatica.
Le forme respiratorie indagabili sono la polmonite enzootica con le sue complicanze e la pleurite. Mentre le polmoniti di origine virale, le polisierositi da *Haemophilus parasuis* ed altre noxe sono molto difficilmente evidenziabili, se non con esami istopatologici od immuno-istochimici. Questo dipende anche dal momento in cui la patologia si innesca in allevamento: la polmonite enzootica di solito inizia intorno ai 150-180 giorni e prosegue la sua azione durante tutta la vita del suino, mentre l'infezione da *Actinobacillus pleuropneumoniae* può verificarsi in qualsiasi fase dell'allevamento.
L'esame istologico è in ogni caso il gold standard, ma questo tipo di ispezione al macello, in particolare rivolta alle lesioni respiratorie, non ha lo scopo di indagare analiticamente le cause, ma esprimere invece sinteticamente l'impatto dei patogeni respiratori sull'allevamento, sia in senso qualitativo, seppur limitatamente a polmonite e pleurite, sia soprattutto in senso quantitativo.
L'espressione numerica del danno, oppurtunamente elaborata con sistemi statici, è fondamentale nella valutazione dei risultati e quindi della gestione sanitaria. Le azioni correttive da adottare in caso di esito giudicato sfavorevole riguardano l'uso degli antibiotici, dei vaccini, nonché gli interventi possibili sul management e l'ambiente.
Come è noto in un allevamento suinicolo il benessere animale e l'antibiotico resistenza sono strettamente correlati alle infezioni/malattie respiratorie, in particolare dopo la fase di "messa a terra".
La validità diagnostica della ispezione si basa sulla numerosità campionaria: mentre in allevamento la visita clinica può essere correlata dalla necroscopia al massimo di qualche carcassa, in macello è possibile esaminare i polmoni di almeno 100 animali (fino a 130 per aumentare la significatività statistica). Ed eventualmente è possibile confrontare tra loro partite che hanno ricevuto trattamenti diversi.
Nella realtà del suino pesante italiano, sulla quale si basano inevitabilmente e da più di 20 anni, i nostri sistemi di valutazione, le lesioni polmonari e pleuriche sono per la grande maggioranza guarite o in corso di guarigione, ma è oramai acclarato che a 9-10 mesi di età esse sono ancora chiaramente evidenziabili e misurabili (la nostra esperienza mostra anche la validità dello stesso tipo di ispezione in vitelloni da carne di 19 mesi).
I metodi adottati da IZSLER per la valutazione sono da sempre la griglia Madec modificata (per la polmonite enzootica) e la griglia "italiana" per la valutazione della pleurite. I risultati (relativi allo scoring di ogni singolo lobo e delle condizioni della pleura) e l'elaborazione statistica, nella valutazione finale, tiene conto delle medie riscontrate sulle migliaia di partite esaminate dal 1998 ad oggi. Recentemente è stato anche fatto un aggiornamento delle medie di riferimento,

che negli ultimi anni hanno visto un miglioramento, dovuto alla diffusa introduzione della vaccinazione e ad altre pratiche di management sanitario. Sporadicamente è stato possibile valutare i suini "leggeri", in questo caso le lesioni pneumoniche sono molto più marcate (con una maggiorazione variabile del 50-100 %) e ovviamente il metro di giudizio è differente.
La ripetitività dei risultati della ispezione da parte di un operatore addestrato è più del 75% per la griglia di Madec, che risulta piuttosto semplice e lineare; essa è leggermente più bassa per la griglia italiana della pleurite, che prevede una valutazione complessiva della pleura e che, nell'ottica applicata al suino pesante, tiene conto soprattutto delle lesioni legate ad *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Questo batterio, introdotto in Italia alla fine degli anni 80, è un patogeno primario; la presenza di alcuni ceppi più virulenti, la co-partecipazione di virus respiratori (in particolare PRRSV) e la comunione delle cellule immunitarie target (macrofagi alveolari), rendono questo microbo uno dei più importanti agenti di malattia respiratoria, non solo in Italia. Lo scoring polmonare al macello è uno strumento fondamentale e direi unico per la valutazione delle lesioni pleuriche di carattere cronico, che costituiscono l'impatto più rilevante di APP su un allevamento, a latere delle forme acute ed iperacute ed alla mortalità a loro legata. La pleurite posteriore causata da questo agente infettivo (score P2 P3 e P4) è decisamente più grave di quella antro-ventrale (score P1), in quanto ostacola la funzionalità respiratoria e provoca dolore, con ovvi riflessi sul benessere e sulla crescita.
La sessione dello scoring rappresenta l'occasione per la raccolta di altre informazioni e l'esecuzione di eventuali prelievi. Le informazioni sono soprattutto quelle relative alla resa degli animali al macello (che ovviamente non dipende soltanto dall'andamento delle forme respiratorie), mentre i prelievi più frequenti sono quelli per esami sierologici, al momento della iugulazione (pratica non scevra di rischi che richiede esperienza ed attenzione), quelli per esami istologici, ma anche quelli per esami batteriologici. A quest'ultimo proposito in sede di ispezione può essere utile distinguere le classiche lesioni tipiche degli esiti della polmonite enzootica, da quelle cicatriziali o più raramente "fresche". Le cicatrici sono la testimonianza della guarigione della polmonite enzootica e delle sue complicanze e rappresentano un esito tutto sommato favorevole. Le lesioni "fresche" invece, che si presentano giallastre anziché violacee (colore del miocardio), perché infiltrate di leucociti, sono la testimonianza della persistenza di germi di irruzione secondaria. Esse, se asportate e sottoposte ad esame batteriologico, permettono l'isolamento di batteri (principalmente *Pasteurella multocida*). L'irruzione secondaria della polmonite non dovrebbe essere presente nel suino pesante a fine carriera. Il rilevo di qualche lesione di questo genere, testimonia il mancato o non efficace uso degli antibiotici. L'aumento di questo genere di rilevo al macello negli ultimi tempi sembra più legato ad un minore uso degli antimicrobici, piuttosto che al fenomeno dell'antibiotico-resistenza.
Proprio in ragione del suo carattere sintetico, lo scoring polmonare al macello, avviene in catena senza necessità di asportare i visceri. La velocità delle catene allestite in Italia consente di eseguire contemporaneamente e agevolmente la valutazione della polmonite e della pleurite. La manualità è semplice in quanto prevede semplicemente di sollevare il cuore per osservare il lobo azigos e la parte interna dei lobi e quindi di ruotare il polmone per esaminare la pleura dorsale, ove hanno sede le tipiche lesioni da ABP. Non sempre nei macelli i polmoni vengono appesi correttamente, tuttavia l'ispettore deve ugualmente esaminare tutti i visceri che si presentano, senza escluderne alcuno per varie difficoltà legate alla lettura della superfice dei polmoni.
Terminati i 100 polmoni previsti, è possibile, sui trenta restanti della partita, eseguire lo scoring dei fegati per l'ascaridiosi. E' tuttavia stato stabilito che non c'è sempre una correlazione tra il numero e la gravità delle lesioni epatiche e l'intensità della infestazione in allevamento. Altre attività come ad esempio lo scoring della rogna sarcoptica, devono necessariamente essere eseguite da altro personale in una fase precedente all'eviscerazione.
In sede di macellazione i polmoni possono presentare lesioni dovute alla inspirazione di sangue

o di acqua calda, che devono essere ben distinte da quelle riferibili a polmonite. Le lesioni invece a carico della pleura, che a volte si presentano come strappi a margini irregolari, provocati dalla estrazione della corata dalla carcassa, vanno distinte dagli artifizi provocati dalle manualità e dal coltello maneggiato dall'operatore. Quando l'adesività pleurica è molto tenace, l'operatore non riesce da estrarre il polmone e, al conseguente passaggio del gancio vuoto, l'ispettore deve controllare a vista la mezzena e comunque punteggiare la pleurite (P3 o P4 a seconda che sia monolaterale o bilaterale). Non è infatti corretto, ai fini statistici, non valutare anche un singolo soggetto, per difficoltà legate alla patologia respiratoria o alla manualità della attività ispettiva, falserebbe il risultato finale.

Il macello è un'azienda privata e lo scoring è un attività concessa su richiesta dell'allevatore, che è cliente dell'impianto. Intermediari di tale richiesta sono in genere le aziende farmaceutiche o più raramente mangimistiche. Negli ultimi anni risulta complicato stabilire con largo anticipo l'orario della macellazione, le liste sono stilate nel corso della giornata precedente e spesso subiscono variazioni a causa d problemi legati ai trasporti o a fattori di tipo commerciale. L'imparzialità della valutazione è garantita dall'anonimato dell'allevatore e dalla raccolta della anamnesi soltanto dopo l'ispezione, ai fini della emissione di un giudizio di merito. Alcuni macelli hanno istituito ed esercitato per un certo periodo, un servizio di scoring polmonare strutturato e sistematico, grazie alla collaborazione di alcuni professionisti.

In conclusione è ovvio che l'esecuzione dello scoring polmonare richiede uno specifico addestramento, un orientamento a privilegiare la sintesi e una elaborazione statistica di supporto. Tuttavia la sua fase più importante e professionale, che avviene dopo la comunicazione dei risultati, è quella del bilancio finale e delle decisioni in merito alle eventuali azioni correttive in allevamento. La raccolta dei dati anamnestici e l'esperienza sono fondamentali affinchè l'ispezione non si traduca semplicemente in una espressione numerica, favorevole o meno in base ad una soglia di riferimento, bensì in una valutazione calzata sulla realtà di quell'allevamento, che dia le risposte necessarie al miglioramento dello stato sanitario. Un'esito decisamente sfavorevole richiede necessariamente dei cambiamenti, uno decisamente favorevole ovviamente no; la professionalità dei veterinari si esprime maggiormente in tutti i casi intermedi, perché non sempre il miglioramento è possibile o fattibile in un ottica di costo/beneficio.

UTILIZZO DELLO SCORE POLMONARE SUL CAMPO
APPLYING THE SLAUGHTER SCORE IN THE FIELD

SCOLLO ANNALISA

Department of Veterinary Sciences, University of Torino, 10095 Grugliasco, Torino, Italy

Negli ultimi anni, l'Italia si è approcciata al sistema di monitoraggio delle lesioni al macello esattamente come già altri Paesi europei avevano fatto negli anni precedenti. Dopo i primissimi tentativi danesi negli anni 80 (Willeberg et al., 1984) ed olandesi negli anni 90 (Elbers et al., 1994), il più sviluppato ed integrato esempio di controllo degli animali in sede di macellazione è forse quello inglese, iniziato nel 2005 con il BPEX Pig Health Scheme (BPHS) (Sanchez-Vazquez et al., 2011). Questo sistema di monitoraggio registra la presenza e la gravità di svariate lesioni dei visceri in sede di ispezione post mortem dei suini clinicamente sani inviati al macello e destinati al consumo umano. Le lesioni osservate sono solitamente associate a patologie che notoriamente causano una riduzione delle performance degli animali. Il sistema di monitoraggio fornisce un importante riscontro dal macello all'allevamento con lo scopo di mettere a conoscenza a monte del ciclo di produzione ciò che spesso è visibile solo a valle. È ormai consolidato che l'ispezione al macello è un utile strumento sia per l'allevatore, che per il monitoraggio delle patologie e per gli studi epidemiologici (Sanchez-Vazquez et al., 2012). La stessa Unione Europea pone tra le priorità quella di migliorare la sorveglianza della salute animale e l'identificazione di semplici ed affidabili indicatori non soltanto di salute, ma anche di benessere. Il vantaggio innegabile della valutazione sanitaria e di benessere al macello tramite la punteggiatura di parametri cosiddetti "iceberg", ovvero indicativi di uno specifico problema in azienda che si esprime in maniera più complessa, è la velocità di raccolta di dati. Con le attuali velocità di macellazione applicate nei comuni impianti di macellazione suinicola, in pochi minuti si è infatti in grado di raggiungere un numero significativo di osservazioni.

Sebbene nel corso degli anni si sia aggiunto il monitoraggio di molte altre lesioni (es. ulcere gastriche, rinite atrofica, lesioni della cute, indice di dermatite, pericarditi ecc.), le lesioni principali rimangono quelle a carico dei polmoni, delle pleure e del fegato. Questo perché i disordini respiratori così come la presenza di parassiti nel fegato sono tra le patologie con maggiore impatto economico nella moderna produzione suinicola (Sorensen et al., 2006; Stewart and Hoyt, 2006). Tuttavia, negli ultimi anni hanno suscitato grande interesse anche le lesioni alle code, per il monitoraggio dei risultati dell'introduzione in allevamento di sottopopolazioni di animali a coda non tagliata, come richiesto dalla legislazione vigente. A conferma dell'importanza del monitoraggio al macello sia per fini sanitari che di benessere, il sistema di autovalutazione ministeriale italiano Classyfarm vi ha dedicato una checklist.

In uno studio inglese, è stato osservato che le aziende che prestavano attenzione al feedback ricevuto con il report al macello miglioravano nel tempo il loro punteggi, presumibilmente adottavano misure migliorative nella gestione delle patologie (Sanchez-Vazquez et al., 2012).

Esempi pratici di applicazione della punteggiatura sanitaria e di benessere al macello per indagini aziendali:

- Valutazione dell'efficacia di interventi manageriali in azienda. Il manager aziendale si trova quotidianamente a prendere decisioni aziendali per migliorare la salute ed il benessere dei suoi animali. Talvolta però è difficile stimare l'efficacia di una determinata scelta, come ad esempio il cambio di un piano vaccinale, l'introduzione di un protocollo antiparassitario o la modifica dell'impianto di ventilazione. La

punteggiatura al macello del viscere di interesse prima e dopo l'intervento è in grado di quantificarne in maniera oggettiva l'efficacia, consentendo di confermare la decisione o modificarla ulteriormente.

- Valutazione del delta sanitario tra animali con le performance migliori e gli animali ad accrescimento rallentato. La serie di report di macellazione effettuata nella stessa banda di animali consente di essere più precisi nella valutazione delle condizioni di allevamento, in quanto permette di descrivere non soltanto le eventuali problematiche dei lotti centrali, ma anche dei "fioroni" e della "coda di banda".

- Paragone di più siti che ricevono gli animali dalla stessa azienda di provenienza. Soprattutto nel caso delle filiere, una stessa scrofaia rifornisce più siti di accrescimento in soccida. Inevitabilmente però, sebbene gli animali siano gli stessi, lo stato sanitario cambia da azienda ad azienda, influenzato dalle strutture, dall'ambiente e dalla gestione. L'indagine approfondita delle aziende di soccida può permettere di individuare i punti critici di alcune aziende e concentrarsi sulla loro risoluzione con interventi specifici.

- Valutazione delle strutture aziendali tramite parametri *animal-based*. La legislazione richiede che le strutture aziendali abbiano determinati requisiti misurabili con il metro. Tuttavia, a volte anche una struttura corretta può predisporre a lesioni dell'animale, come spesso accade anche il contrario. La valutazione aziendale non più con misurazioni strutturali ma tramite parametri di osservazione diretta dell'animale è un metodo di indagine molto più avanzato e sensibile (per quanto i parametri minimi di legge vadano sempre e comunque garantiti). Ad esempio, una pavimentazione può causare o meno delle zoppie: la valutazione al macello del piede degli animali è un ottimo indicatore *animal-based*.

BIBLIOGRAFIA

1. Elbers, A.R.W., Tielen, M.J.M., Snijders, J.M.A., Cromwijk, W.A.J., Hunneman, W.A., 1992. Epidemiological studies on lesions in finishing pigs in the Netherlands. I. Prevalence, seasonality and interrelationship. Preventive Veterinary Medicine 14, 217-231.
2. Sanchez-Vazquez, M. J., et al. "The British pig health schemes: integrated systems for large-scale pig abattoir lesion monitoring." Veterinary Record-English Edition 169.16 (2011): 413.
3. Sanchez-Vazquez; Mirjam Nielen; George J. Gunn; Fraser I. Lewis (2012). Using seasonal-trend decomposition based on loess (STL) to explore temporal patterns of pneumonic lesions in finishing pigs slaughtered in England, 2005-2011. Prev Vet Med. 2012 Apr 1; (1-2):65-73.
4. Sorensen, V., Jorsal, S.E., Mousin, J., 2006. Diseases of Respiratory System. In: Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), Diseases of Swine. Blackwell Publishing, pp. 149-177.
5. Stewart T.B. Hoyt P.G. 2006. Internal Parasites. In: Straw, EB; Zimmerman, JJ; D'Allaire, S; Taylor, DJ;. Diseases of Swine. Ninth Edition. Blackwell Publishing, pp. 904-905.
6. Willeberg, P., Gerbola, M.-A., Petersen, B.K., Andersen, J.B., 1984. The Danish pig health scheme: Nation-wide computer-based abattoir surveillance and follow-up at the herd level. Preventive Veterinary Medicine 3, 79-91.

COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

STUDIO *INTRA-FARM* DELLA DINAMICA DELLE POPOLAZIONI DI *STREPTOCOCCUS SUIS* IN SUINI COMMERCIALI

POPULATION DYNAMICS OF *STREPTOCOCCUS SUIS* IN AN INTRA-FARM STUDY IN COMMERCIAL PIGS

CORDIOLI B.[1], BACCHIN C.[1], DRIGO I.[1], ALBORALI G.L.[2], TONNI M.[2], GUARNERI F.[2], VIO D.[3], USTULIN M.[3], ZOPPI S.[4], TONON F.[5], BANO L.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Treviso*
[2]*Istituto Zooprofilattico e Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Sezione Diagnostica di Brescia*
[3]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Diagnostica di Pordenone*
[4] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Diagnostica Generale di Torino*
[5] *Medico Veterinario Libero Professionista - SUIVET*

Parole chiave: *Streptococcus suis*; caratterizzazione molecolare
Keywords: *Streptococcus suis*; molecular characterization

RIASSUNTO

Streptococcus (S.) suis è uno dei principali patogeni batterici della suinicoltura moderna. Il contenimento e la prevenzione della streptococcosi suina sono affidati a trattamenti antimicrobici e alla vaccinazione, ma l'efficacia di quest'ultima potrebbe risentire delle variazioni antigeniche dei ceppi circolanti in azienda.
Con il presente studio si è indagata l'evoluzione delle popolazioni di *S. suis* isolate da cervello di suini rispetto al sierotipo, ad alcuni fattori di virulenza e alle correlazioni genetiche tra i ceppi nel tempo, nella stessa azienda (PFGE, MLST).
Sono stati analizzati 43 ceppi clinici isolati in 4 allevamenti della provincia di Treviso. Trentadue ceppi sono risultati appartenere al sierotipo "9", 3 al "2", 4 al "7" e il profilo di virulenza più frequente (33 isolati) è risultato *mrp+ efp- sly+*.
La PFGE ha evidenziato 8 cluster, di cui uno ampio gruppo (cluster I) di 28 ceppi isolati da tutti i 4 allevamenti con una similarità del 100% (cloni). Sulla base dei risultati della PFGE, sono stati selezionati 16 ceppi per MLST che sono risultati appartenere ai seguenti *sequence type* (ST): ST1, ST16, ST29, ST123 e a due nuovi ST ancora non segnalati. Tutti i ceppi dell'ampio cluster I sono risultati ST123. Negli allevamenti si è assistito a dinamiche di popolazione diverse nel tempo con la comparsa e/o scomparsa di diversi sierotipi, profili di virulenza, pulsotipi e ST, suggerendo strategie vaccinali mirate e supportate da un approccio diagnostico approfondito.

ABSTRACT

Streptococcus (S.) suis is one of the most important bacterial pathogens in modern pig farming. Antimicrobial treatments and vaccination are the main strategies to prevent and contain swine streptococcosis, but the effectiveness of the vaccines could be affected by the antigenic variations (serotype) that might occur over time in the farm.
This study investigated the evolution of *S. suis* populations isolated from pig brains as far as the serotype, the virulence factors and the genetic correlations (PFGE, MLST) are concerned.
Forty-three clinical strains isolated in 4 farms in the province of Treviso were included in the study. Most of them (32) were found to belong to serotype "9", 3 to "2", 4 to "7"

and the most frequent virulence profile (33 isolates) was *mrp* + *efp*- *sly* +.
The PFGE revealed 8 clusters, including a large group of 28 strains (cluster I) with 100% similarity (clones) isolated from all the farms. Based on the results of the PFGE, 16 strains were selected for MLST and the following sequence types (ST) were detected: ST1 (1), ST16 (2), ST29 (1), ST123 (10) and two new STs not yet described. All strains in cluster I were ST123. In each farm the appearance and/or disappearance of different *S. suis* strains with different genetic characteristics were observed over time, suggesting targeted vaccination strategies supported by an in-depth diagnostic approach.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis (*S. suis*) è un microrganismo Gram positivo, anaerobio facoltativo a diffusione mondiale compreso nella famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, phylum *Firmicutes* (Okura *et al.*, 2016).
La specie batterica presenta caratteristiche eterogenee dal punto di vista fenotipico, genotipico e nella varietà di manifestazioni cliniche ad esso associate. Infatti, *S. suis* può colonizzare i primi tratti dell'apparato respiratorio di soggetti portatori (*carrier*), provocare gravi forme cliniche spesso letali (meningo-encefaliti, endocarditi, setticemia, artriti e morte improvvisa) e agire come batterio opportunista in associazione ad altri patogeni (Barrow, 2021).
Si tratta di una delle problematiche più attuali che affliggono la suinicoltura moderna, in quanto determina pesanti perdite economiche date dalla morte dei soggetti colpiti, dalla gestione degli scarti e dal costo del trattamento degli animali con il conseguente rischio di selezionare popolazioni microbiche antibioticoresistenti (Segura *et al.*, 2020). Inoltre, assume considerevole importanza dal punto di vista zoonosico, in quanto vi sono delle segnalazioni di episodi di malattia nell'uomo (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014).
Per l'identificazione del patogeno è possibile valutare la presenza della sequenza genetica altamente conservata codificante la glutammato deidrogenasi (*gdh*) e l'appartenenza a uno degli oltre 30 sierotipi noti (Okwumabua *et al.*, 2002). Gli isolati di *S. suis*, infatti, rientrano in una complessa popolazione di ceppi classificabili sulla base dell'espressione di specifici polisaccaridi capsulari (*cps*), antigeni di superficie che agiscono come barriera fisica in grado di proteggere il batterio dalla fagocitosi e renderne più difficoltosa la *clearance* (Zheng *et al.*, 2017; Fittipaldi *et al.*, 2012).
I marker genetici di patogenicità più indagati sono 3: la suilisina (*sly*), la sostanza polimerica extracellulare (*epf*) e la proteina rilasciata dalla muramidasi mistica (*mrp*) (Tonni *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2009). Questi geni codificano rispettivamente per un'emolisina, una sostanza escreta in grado di aumentare l'invasività del batterio e una proteina ancorata alla parete cellulare che partecipa all'attivazione del fibrinogeno con conseguente degradazione della fibrina e danno tissutale (Fittipaldi *et al.*, 2012; Segura *et al.*, 2016).
L'espressione dei fattori associati a patogenicità non è discriminante sull'effettivo risvolto clinico dell'isolato batterico in campo, poiché ceppi risultati *epf*- *mrp*- *sly*- sono comunque in grado di dare setticemia nel suino (Segura *et al.*, 2020).
Data l'estrema eterogenicità genetica anche all'interno di una singola unità epidemiologica è utile associare più tecniche di tipizzazione molecolare per un studio completo dei pattern di *S. suis* circolanti in allevamento. La PFGE (*pulsed-field gel electophoresis*) utilizza la restrizione enzimatica dell'intero genoma batterico e permette di suddividere gli isolati batterici in cluster a seconda dei coefficienti di similarità tra i pulsotipi ottenuti (Vela *et al.*, 2003). La *multilocus sequence typing* (MLST), invece, è una metodica basata sul sequenziamento del DNA dei geni "*housekeeping*" e permette di comparare il sequence type (ST) ottenuto con quelli presenti in un database globale ottenendo infor-

mazioni epidemiologiche d'interesse (Maiden, 2006).
Lo studio dei ceppi di *S. suis* circolanti nei singoli allevamenti può fornire informazioni utili ad indirizzare l'immunoprofilassi, sia attraverso l'impiego di vaccini commerciali o stabulogeni e per verificarne l'efficacia sulla base dell'evoluzione dei ceppi isolati successivamente alla vaccinazione.

MATERIALI E METODI

Isolati batterici

Lo studio ha riguardato 4 aziende (A, G, R, S) della provincia di Treviso che dal 2017 al 2021 hanno effettuato 29 conferimenti di soggetti da ingrasso deceduti spontaneamente, da cui sono stati isolati 43 ceppi (6 da A, 16 da G, 8 da R, 13 da S). In occasione di 10 conferimenti sono stati tipizzati più ceppi isolati da soggetti diversi conviventi.
L'isolamento è avvenuto da campioni di cervello, seminati su piastre di agar sangue incubate per 24-48 ore a 37° in condizioni di microaerofilia e l'identificazione è avvenuta impiegando lo strumento MALDI Biotyper Microflex LT (Bruker Daltonics, Germany).

Fattori genetici di virulenza e sierotipizzazione

Gli isolati batterici sono stati sottoposti a shock termico (lisi-bollitura) per poter estrarre il DNA totale e amplificare con una PCR multiplex le seguenti aree genomiche: *gdh, sly, mrp, epf, cps9h, cps2j* e *cps7h* (Silva *et al.*, 2006). In questo modo è stato possibile attribuire il sierotipo e valutare l'espressione di fattori associati a patogenicità.

Pulsed-field gel electophoresis (PFGE)

L'estrazione del DNA è stata effettuata a partire da colture pure di 18-24 ore in agar sangue di *S. suis* seguendo il protocollo proposto da Vela *et al.* (2003). Il pulsotipo ottenuto è stato elaborato attraverso il software BioNumerics ver. 7.6 utilizzando il Coefficiente di similitudine di Dice e come algoritmo di clustering l'UPGMA con valori di tolleranza e ottimizzazione dell'1,5%. Sono stati considerati appartenenti allo stesso Cluster e quindi epidemiologicamente correlati tutti i ceppi con Coefficiente di Dice pari o superiore all'80%.

Multi Locus Sequence Typing (MLST)

Sulla base del dendrogramma (Figura 1) sono stati selezionati 16 ceppi batterici da sottoporre a MLST. L'analisi è stata eseguita secondo il protocollo descritto da King *et al.* (2002), che prevede l'amplificazione dei seguenti geni: *aroA*, *cpn60*, *dpr*, *gki*, *mutS*, *recA* e *thrA*. Le sequenze ottenute sono state analizzate ed inserite nel *S. suis* sequence/profile database (https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis).
L'elaborazione grafica è stata ottenuta impiegando il software Bionumericis, versione 7.6 (Applied Maths).

RISULTATI

In figura 1 sono riportati i risultati relativi a PFGE, MLST, sierotipizzazione e profilo di virulenza dei ceppi testati.
Trentadue ceppi (83%) sono risultati appartenere al sierotipo "9", 3 al "2", 4 al "7" mentre 4 isolati degli allevamenti R (1), G (2) ed S (1) non appartenevano ad alcuno dei sierotipi ricercati. Due ceppi (allevamento S) non hanno presentato il gene *gdh* e il profilo di virulenza più frequente (33 isolati) è risultato *mrp*+ *efp*- *sly*+. I geni di virulenza maggiormente presenti, infatti, sono stati *mrp* (41 ceppi) e *sly* (36 ceppi), mentre il gene *efp* è stato evidenziato solo in 3 ceppi dello stesso episodio morboso.

Nel dendrogramma originato dalla PFGE (Fig. 1) è possibile distinguere otto diversi cluster (I-VIII) di numerosità variabile da 1 a 30 isolati. Il cluster I comprende 30 ceppi appartenenti a tutti gli allevamenti esaminati, di cui 28 presentano tra loro un'omologia del 100% (cloni), suggerita anche dall'appartenenza allo stesso ST123. All'interno di questo numeroso cluster il profilo di virulenza più rappresentato (26 ceppi) è *mrp+ efp-sly+*. Il sierotipo prevalente è il "9" (26 isolati), mentre 3 ceppi appartengono al "2" e 1 al "7". I 4 ceppi appartenenti a sierotipi "2" e "7" del cluster I provengono tutti all'azienda A. Dall'allevamento A sono stati conferiti 4 gruppi di suini tutti nel 2020 per un totale di 6 ceppi analizzati. Tutti i ceppi si collocano nel cluster I e 3 di questi presentano lo stesso profilo di virulenza e sierotipo.
In generale, i ceppi isolati da soggetti diversi di uno stesso conferimento, risultano appartenere al medesimo cluster, profilo di virulenza e sierotipo, ad eccezione di 3 casi sui 10 totali dai quali è disponibile più di un isolato. In uno di questi ultimi, 2 ceppi isolati simultaneamente da R si collocano in 2 diversi cluster (I e VIII), sebbene presentino lo stesso sierotipo e profilo di virulenza. Nel secondo (allevamento S), i 2 isolati da soggetti diversi differiscono per sierotipo, per profilo di virulenza e cluster. Nel terzo (allevamento G), dei 4 ceppi isolati da soggetti diversi, 3 sono tra loro cloni (cluster V), appartengono allo stesso sierotipo e hanno lo stesso profilo di virulenza, mentre il quarto appartiene al cluster 3 e non è risultato sierotipizzabile.
Sulla base dei risultati della PFGE, sono stati selezionati 16 ceppi per MLST (fig. 1): 10 dal cluster I, e uno per ciascuno degli altri cluster, ad eccezione del II. I 10 isolati del cluster I sono risultati tutti ST123, che non è stato rilevato negli altri cluster. Nel cluster III è presente il ST29, nel V il ST1, nel VI e VII il ST16. Due nuovi sequence type non ancora inseriti all'interno del S.suis sequence/profile database (https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis) si collocano nei cluster IV e VIII.

DISCUSSIONE

Numerosi lavori scientifici di caratterizzazione genetica di *S. suis* hanno indagato i fattori di virulenza o le correlazione epidemiologiche che esistono tra ceppi isolati in allevamenti diversi o in determinate aree geografiche (Wei *et al.,* 2003; Gottschalk *et al.,* 2013; Cucco *et al.*, 2022). Con questo lavoro si è voluto invece studiare se vi sono diverse popolazioni di *S. suis* in uno stesso allevamento in uno stesso momento e come queste si modifichino nel tempo, impiegando diverse tecniche biomolecolari.
I risultati ottenuti evidenziano come vi sia un'ampia popolazione di ceppi isolati in tutti i 4 allevamenti, che presenta caratteristiche comuni prevalenti per quanto riguarda la positività al fattore di virulenza *mrp*, l'appartenenza al sierotipo "9", al cluster I e al ST123. A partire dal 2018, tali ceppi si sono resi responsabili di episodi ricorrenti di malattia negli allevamenti considerati, nel corso di tutti gli anni presi in esame.
Diverse combinazioni nell'espressione dei fattori di virulenza e nell'appartenenza al sierotipo sono compatibili con un elevato grado di omologia alla PFGE e l'appartenenza al medesimo ST.
Ciò nonostante si è osservata anche la sporadica introduzione di ceppi con caratteristiche genetiche diverse, che si potrebbero ripercuotere sull'efficacia della vaccinazione e sulla sensibilità agli antibiotici. Infatti, alcuni autori hanno dimostrato come vi possano essere profili di resistenza associati ad alcuni ST, come ad esempio quella per la penicillina collegata al ST123 (Cucco *et al.,* 2022).
E' interessante notare come la maggior parte dei ceppi isolati da soggetti conviventi, sia costituita da cloni dello stesso sierotipo e con lo stesso profilo di virulenza. In 3 episodi questo non si è verificato, e ciò suggerisce di procedere alla caratterizzazione di più iso-

lati di uno stesso focolaio, soprattutto quando si devono selezionare per l'allestimento di vaccini stabulogeni o per testare l'antimicrobicosensibilità del ceppo.
Dei 16 ceppi sottoposti a MLST, 14 si sono dimostrati appartenere a ST noti. Tra questi il più rappresentato è stato il ST123, descritto per la prima volta in Spagna e già segnalato in Italia (Cucco *et al.*, 2022). Secondo uno studio condotto ormai 8 anni fa, il ST1, presente nel cluster V del solo allevamento "G", sarebbe il più diffuso in Europa e risulta frequentemente isolato in casi di zoonosi (Goyette-Desjardins *et al.*, 2014). Nel sequence/profile database sono presenti oltre 450 isolati di *S. suis* ST1 ottenuti da sangue e organi sia di uomo che di suino provenienti da tutti i continenti a partire dal 1985, quando è stato sequenziato il primo ceppo ST1 in Cina da sangue di un uomo con setticemia. Si evidenzia quindi come all'interno dell'allevamento G in un solo anno circolassero diversi *sequence type*, i quali però non si ritrovano l'anno successivo.
Il ST16 è stato isolato per la prima volta in Spagna, e risulta ST prevalente in Olanda dove causa forme cliniche invasive del suino. Il ST29, isolato spesso dal 1992 ad oggi sia da organi di soggetti sintomatici (cervello, polmone, fluido articolare) sia da tamponi nasali di *carriers*, appare associato al sierotipo 7 e al genotipo *mrp+ sly-* (così come i ceppi isolati nel presente studio) ed è geograficamente distribuito in numerosi paesi europei tra cui UK, Germania, Olanda, Polonia, Austria, Finlandia e Italia, dove è stato isolato da soggetti con forme cliniche articolari, respiratorie e soprattutto nervose (Cucco *et al.*, 2022). Rieckmann e colleghi (2018), infatti, evidenziano come ceppi che si identificano con il ST29 siano in grado di eludere il sistema immunitario nelle prime fasi post-svezzamento e prolungare la fase di batteriemia, momento cruciale nella patogenesi delle meningiti da *S. suis* (Fittipaldi *et al.*, 2012).
Sarà interessante verificare come varieranno le popolazioni di *S. suis* in seguito alla pressione esercitata dalle vaccinazioni con ceppi omologhi.

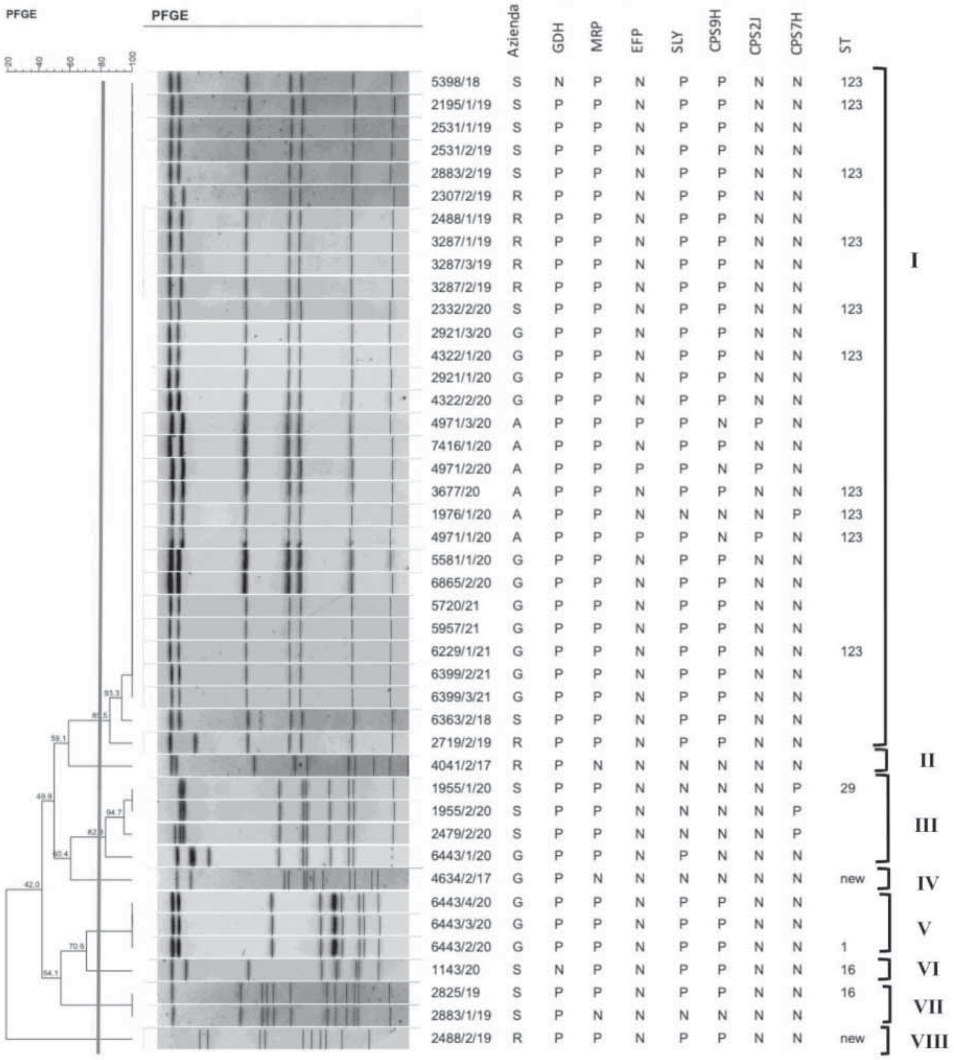


Figura 1. Dendrogramma originato dai pattern PFGE dei ceppi di *S.suis* presenti nei 4 allevamenti oggetto di studio, in cui è possibile distinguere otto cluster di numerosità variabile da 1 a 30 ceppi. La linea rossa indica la soglia di omologia dell'80%.
Figure 1. Tree diagram showing PFGE patterns of *S. suis* strains isolated in the farms studied in the present work showing 8 different clusters including between 1 and 30 strains. The red line represents the 80% of homology threshold.

CONCLUSIONI

La caratterizzazione dei ceppi di *S. suis* eseguita a vari livelli può risultare utile per selezionare i ceppi da inserire in presidi immunizzanti autogeni e per conoscere come questi si modifichino nel tempo rispetto a caratteristiche antigeniche (sierotipo) e fattori genetici di virulenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Cucco, L., Paniccià, M., Massacci, F. R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., Di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Cammà, C., & Magistrali, C. F. (2022). New Sequence Types and Antimicrobial Drug-Resistant Strains of *Streptococcus suis* in Diseased Pigs, Italy, 2017-2019. Emerging infectious diseases, 28(1), 139–147. https://doi.org/10.3201/eid2801.210816
2. Estrada AA, Gottschalk M, Rossow S, Rendahl A, Gebhart C, Marthaler DG (2019) Serotype and Genotype (Multilocus Sequence Type) of *Streptococcus suis* Isolates from the United States Serve as Predictors of Pathotype. J Clin Microbiol.; 57(9):
3. Fittipaldi N., Segura M., Grenier D., Gottschalk M. (2012). Virulence factors involved in the pathogenesis of the infection caused by the swine pathogen and zoonotic agent *Streptococcus suis*. Future Microbiol. 7(2):259-79.
4. Gottschalk, M., Lacouture, S., Bonifait, L., Roy, D., Fittipaldi, N., & Grenier, D. (2013). Characterization of *Streptococcus suis* isolates recovered between 2008 and 2011 from diseased pigs in Quebec, Canada. Veterinary microbiology, 162(2-4), 819-825.
5. 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, 3:1, 1-20.
6. https://pubmlst.org/organisms/streptococcus-suis
7. Kerdsin A, Hatrongjit R, Gottschalk M, Takeuchi D, Hamada S, Akeda Y, Oishi K. (2017). Emergence of *Streptococcus suis* serotype 9 infection in humans. J Microbiol Immunol Infect.;50(4):545-546. doi: 10.1016/j.jmii.2015.06.011. Epub 2015 Aug 20. PMID: 26362754.)
8. King SJ, Leigh JA, Heath PJ, Luque I, Tarradas C, Dowson CG, Whatmore AM. (2002) Development of a multilocus sequence typing scheme for the pig pathogen *Streptococcus suis*: identification of virulent clones and potential capsular serotype exchange. J Clin Microbiol. 40(10):3671-80. doi: 10.1128/JCM.40.10.3671-3680.2002. PMID: 12354864; PMCID: PMC130843.
9. Maiden MC. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. Annu Rev Microbiol. 60: 561–588.
10. Okura M., Osaki M., Nomoto R., Arai S., Osawa R., Tsutomu S., Takamatsu D. (2016). Current Taxonomical Situation of *Streptococcus suis*. Pathogens 5, 45.
11. Paul Barrow. (2021) Major pathogens and pathogenesis in Advancements and Technologies in Pig and Poultry Bacterial Disease Control 1a ed. Academic Press
12. Rieckmann, K., Seydel, A., Szewczyk, K., Klimke, K., Rungelrath, V., Baums, CG (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. Vet Res 49, 48. https://doi.org/10.1186/s13567-018-0544-8
13. Schultsz, C.; Jansen, E.; Keijzers, W.; Rothkamp, A.; Duim, B.; Wagenaar, J.A.; van der Ende, A. (2012). Differences in the population structure of invasive *Streptococcus suis* strains isolated from pigs and from humans in The Netherlands. PLoS ONE, 7, e33854.
14. Segura M., Aragon V., Brockmeier S.L., Gebhart C., Greeff A., Kerdsin A., O'Dea M.A., Okura M., Saléry M., Schultsz C., Valentin-Weigand P., Weinert LA., Wells J.M., Gottschalk, M. (2020). Update on *Streptococcus suis* Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on S. suis. Pathogens 9, no. 5: 374.
15. Segura M., Calzas C., Grenier D., Gottschalk M. (2016). Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: fighting against nonspecific defenses. FEBS Lett., 590, 3772-3799.

16. 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. (2021). Caratterizzazione molecolare e profili di antimicrobico-resistenza di ceppi di *Streptococcus suis* isolati in allevamenti del nord Italia nel periodo 2013-2020. In: "Volumi degli atti 2020 e 2021", Verona, XLVI Meeting Annuale SIPAS, 133-143.
17. Vela A. I., Goyache J., Tarradas C., Luque I., Mateos A., Moreno M. A., Borge C., Perea J. A., Domínguez L., Fernández-Garayzábal J. F. (2003). Analysis of genetic diversity of *Streptococcus suis* clinical isolates from pigs in Spain by pulsed-field gel electrophoresis. Journal of clinical microbiology, 41(6), 2498–2502.
18. Wei, Z., Li, R., Zhang, A., He, H., Hua, Y., Xia, J., Cai, X., Chen, H., Jin, M. (2009). Characterization of *Streptococcus suis* isolates from the diseased pigs in China between 2003 and 2007. *Veterinary microbiology*, *137*(1-2), 196-201.
19. Willemse, N., van der Ark, K.C.H., Stockhofe-Zurwieden, N. *et al.* (2019) Clonal expansion of a virulent *Streptococcus suis* serotype 9 lineage distinguishable from carriage subpopulations. Sci Rep 9, 15429. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0
20. Zheng H, Du P, Qiu X, Kerdsin A, Roy D, Bai X, Xu J, Vela AI, Gottschalk M (2018) Genomic comparisons of *Streptococcus suis* serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. Vet Res. Jan 9; 49(1):1.
21. Zheng H., Qiu X., Roy D., Segura M., Du P., Xu J., Gottschalk, M. (2017). Genotyping and investigating capsular polysaccharide synthesis gene loci of non-serotypeable *Streptococcus suis* isolated from diseased pigs in Canada. Vet. Res. 48, e10.

DETERMINANTI DELL' EPIDEMIOLOGIA DEL PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS (PRRSV) IN UNA GRANDE FILIERA INTEGRATA: PUNTI DI DEBOLEZZA O OPPORTUNITÀ DI AZIONE?

PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME (PRRS) EPIDEMIOLOGY IN AN INTEGRATED PIG COMPANY OF NORTHERN ITALY: A MULTILEVEL THREAT REQUIRING MULTILEVEL INTERVENTIONS

FRANZO G. [1], BARBIERATO G.[1], PESENTE P.[2], LEGNARDI M.[1], TUCCIARONE C.M.[1], SANDRI G.[2], DRIGO M[1].

Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), University of Padua, Legnaro, Padua, Italy.; [2]Laboratorio Tre Valli, San Michele Extra, (VR), Italia.

Parole chiave: Porcine reproductive and respiratory syndrome; Epidemiologia molecolare ; Filodinamica.
Keywords: Porcine reproductive and respiratory syndrome; Molecular epidemiology; Phylodynamics.

RIASSUNTO
La Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) è probabilmente la malattia virale di maggior rilevanza per la suinicoltura, e i vari tentativi di eradicazione e controllo sono stati in massima parte frustrati. Al momento mancano studi che valutino oggettivamente i determinanti dell'epidemiologia molecolare dei PRRSv. Circa mille sequenze del gene ORF7, ottenute da campioni prelevati nel Nord Italia nel periodo 2004-2021 da una filiera integrata che implementava una rigida separazione fra le singole filiere produttive e un'organizzazione gerarchica del flusso di suini, sono state selezionate. Le dinamiche della popolazione nel tempo, i flussi virali entro e fra filiere produttive e il contributo di filiere o allevamenti esterni sono state stimate. Infine, la diffusione del virus sul territorio è stata ricostruita tramite un approccio filogeografico, correlandola a diversi determinanti ambientali. L'epidemiologia di PRRSV appare determinata da diversi fattori, manageriali (e.g. strategie di immunizzazione, compartimentalizzazione) e ambientali (clima, altitudine, densità della rete stradale, etc.). I piccoli allevamenti rurali sono inoltre emersi come una probabile minaccia per l'introduzione del virus nelle grandi filiere. Appare evidente come nessuna misura possa dirsi efficace individualmente e un approccio multidimensionale, concertato fra le fasi del processo produttivo e fra le diverse realtà produttive, sia fondamentale per un effettivo controllo dell'infezione.

ABSTRACT
Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) is probably the most relevant swine disease, whose eradication and long-term control have often been frustrating. Few studies linking its molecular epidemiology to the relative risk factors are available. Approximately one thousand ORF7 sequences were obtained from strains collected between 2004 and 2021 from the largest Italian pig company, which implements strict compartmentalization among independent 3-sites pig flows. The history and dynamics of the viral population were reconstructed and linked to managerial choices. The viral

fluxes within and among independent pig flows and the contribution of other integrated pig companies and rurally risen pigs were evaluated. Finally, viral circulation in Northern Italy was reconstructed using a continuous phylogeographic approach and the impact of several environmental features on PRRSV strain persistence and spreading was assessed. The results demonstrate that PRRSV epidemiology is shaped by a multitude of managerial (e.g. immunization strategy, independent pig flows) and environmental (e.g. climate, altitude, pig density, road density, etc.) factors. Small farms emerged as a threat for larger, integrated companies. These results suggest that none of the implemented measures can be considered effective alone and a multidimensional approach, ranging from individual herd management to collaboration among different companies, is mandatory for effective infection control.

INTRODUZIONE

La Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) è causata da due specie virali, porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 (PRRSV-1) e 2 (PRRSV-2) recentemente riclassificate come *Betaarterivirus suid* 1 and *Betaarterivirus suid 2*, genere *Betaarterivirus*, famiglia *Arteriviridae.* Il PRRSV è caratterizzato da un genoma a singolo filamento di RNA a polarità positiva (ssRNA(+)) di circa 15kb. Come altri ssRNA(+) presenta un alto tasso evolutivo, dovuto sia ad un elevato tasso di mutazioni (~10^{-3}-10^{-5} sostituzioni/sito/anno) che di ricombinazione. Indicativamente tre-quarti del genoma (ORF1a e ORF1b) codificano per proteine non strutturali, mentre la restante parte include ORFs codificanti essenzialmente per quelle strutturali (Dokland, 2010). Fra queste, la Glicoproteina 5 (GP5) e il nucleocapside (N), codificati dall'ORF5 e 7, sono particolarmente studiate e sequenziate in virtù del loro ruolo biologico e rilevanza negli studi di epidemiologia molecolare. La PRRS è considerata una delle malattie di maggior impatto economico per la suinicoltura mondiale, essendo responsabile di forme respiratorie e sistemiche, patologia riproduttiva, diminuzione delle performance produttive e mortalità, oltre ad avere un effetto sinergico con altre infezioni virali e batteriche. Infine, non devono essere trascurati i costi diretti e indiretti associati al controllo dell'infezione stessa (Chand et al., 2012). Nel corso del tempo sono stati sviluppati ed introdotti diversi vaccini e protocolli vaccinali. Tuttavia, a causa della limitata cross-protezione fra ceppi fenotipicamente diversi e della capacità del virus di eludere la risposta immunitaria, la loro efficacia si è rivelata sub-ottimale (Chae, 2021; Zhou et al., 2021). L'adozione di adeguate misure di biosicurezza è quindi di fondamentale importanza per prevenire l'introduzione e la diffusione virale in allevamento. Un'efficace implementazione di queste misure è una sfida non facile a causa della facilità di trasmissione virale, mediata da contatti diretti e indiretti, che coinvolgono la movimentazione animale, seme, fomiti, via aerogena, ecc (Corzo et al., 2010). Nonostante queste evidenze, solo un limitato numero di studi ha valutato in modo oggettivo i determinanti della diffusione virale e la maggior parte dei dati disponibili sono riconducibili a report occasionali o a studi focalizzati su singole variabili. Anche in Italia, le informazioni disponibili sono parziali: la prevalenza dell'infezione è considerata elevata, anche se non sempre in presenza di segni clinici. Geneticamente, in precedenti studi, sono state identificate 2 cladi principali, entrambe parte del tipo 1, sottotipo 1, che comprendono la maggior parte dei ceppi italiani (Franzo et al., 2015). Tuttavia, i determinanti all'origine di questo scenario non sono mai stati indagati nel dettaglio. Conseguentemente, un approccio basato su un'analisi oggettiva dei dati è tutt'ora assente e molte delle scelte sono delegate all'intuito ed esperienza dei veterinari, o a limiti di natura pratica.

Il presente studio mira a ricostruire la storia e l'epidemiologia di PRRSV in Italia e

valutarne i determinanti, combinando dati di epidemiologia molecolare, management aziendale e caratteristiche ambientali tramite un modello statistico unitario, beneficiando dei recenti sviluppi nel campo della filodinamica. Un ampio spettro di metodi statistici è stato quindi applicato per valutare in modo formale e oggettivo i fattori di rischio responsabili della persistenza e diffusione di PRRSV. A tal fine si è potuto sfruttare di un dataset di oltre mille sequenze di ORF7 ottenute in un periodo di 17 anni (2004-2021) dalla maggiore filiera operante nel Nord Italia (da qui in avanti chiamata "*l'Azienda*"), organizzata sulla base di una rigorosa struttura gerarchica con diversi flussi di suini indipendenti gestiti con un sistema a 3-siti produttivi (i.e. scrofaie, svezzamenti e ingrassi). La conseguente identificazione di potenziali punti di controllo potrebbe fornire importanti benefici sia ai veterinari di campo che ai manager per ottimizzare e prioritizzare l'allocazione delle risorse e quindi contribuire alla salute, benessere e produttività animale.

MATERIALI E METODI

Database delle sequenze

Il dataset di sequenze ORF7 *è* stato generato durante la routinaria attività diagnostica dell'*Azienda* nel periodo 2004-2021. La maggior parte delle sequenze erano associate ai seguenti metadati: data di campionamento, località (latitudine e longitudine), filiera e sito produttivo (i.e. scrofaia, svezzamento o ingrasso). Le sequenze sono state allineate fra loro e con quelle dei vaccini comunemente utilizzati. Tutte le sequenze che rivelavano una forte associazione con i ceppi vaccinali sono state escluse da ulteriori analisi. La presenza di fenomeni di ricombinazione *è* state testata ed eventuali stipiti ricombinanti sono stati esclusi. Il segnale temporale e filogenetico *è* stato valutato con TempEst e Iq-Tree (Nguyen et al., 2015; Rambaut et al., 2016).

Ricostruzione delle dinamiche di popolazione e del flusso virale all'interno dell'Azienda

Il dataset è stato analizzato mediante l'approccio Bayesiano alla coalescente seriale implementato in BEAST 10.1 (Suchard et al., 2018) al fine di stimare diversi parametri di popolazione quali l'origine dell'antenato comune (time to most recent common ancestor, tMRCA), il tasso evolutivo e le dinamiche della popolazione virale. Il flusso virale fra i diversi siti del processo produttivo è stato valutato utilizzando una "discrete trait analysis (DTA)", che stimasse la più probabile localizzazione degli antenati dei ceppi campionati, e quindi la direzionalità e l'intensità del trasferimento virale. I diversi parametri sono stati stimati tramite una catena di simulazioni Markov Chain Monte Carlo (MCMC) di 200 milioni di generazioni. La qualità e robustezza dei risultati ottenuti sono state analizzate e riassunte con Tracer 1.7. Le stime ottenute sono state riassunte in termini di media e 95% High Posterior Probability (95HPD). Similmente, è stato ottenuto un Maximum Clade Credibility tree (MCC), sulla base di tutti gli alberi generati nel corso delle simulazioni. Il software SpreadD3 è stato utilizzato per graficare il processo di diffusione virale e per valutare le connessioni fra siti produttivi caratterizzati da un adeguato supporto statistico (i.e. Bayesian Factor >10). Ulteriori statistiche riassuntive e grafici sono stati generati in R.

Migrazione dei ceppi fra flussi produttivi

Come precedentemente accennato, l'*Azienda* è strutturata con un sistema gerarchico organizzato in flussi suini indipendenti basati su 3 siti produttivi. Più nel dettaglio, sono presenti 18 flussi indipendenti in cui ogni scrofaia fornisce suini a specifici svezzatori, tutti gestiti con un sistema "tutto pieno/tutto vuoto". Gli svezzatori a loro

volta trasferiscono gli animali a diversi ingrassi parte della stessa catena produttiva, anch'essi operanti in un sistema "tutto pieno/tutto vuoto". I contatti diretti ed indiretti fra flussi indipendenti sono minimizzati per quanto possibile. Tuttavia, l'oggettiva valutazione dell'efficacia di questa separazione è di difficile realizzazione. A tal fine, la migrazione dei ceppi fra flussi produttivi è stata valutata tramite un'analisi di "Structured coalescent" implementata nella libreria BAyesian STructured coalescent Approximation (BASTA) di BEAST2 (de Maio et al., 2015). In breve, questo approccio prevede di poter considerare la popolazione virale come divisa in demi (o isole) (i.e. i flussi produttivi indipendenti), ciascuna caratterizzata da una data dimensione e connesse da un certo tasso di migrazione.
Due ulteriori analisi sono state effettuate includendo uno o due *demi* "fantasma", ossia delle popolazioni di cui si ipotizza l'esistenza ma per le quali non sono disponibili delle sequenze. Questi rappresentavano rispettivamente, nel primo caso, le restanti realtà produttive nel loro complesso e, nel secondo, le altre grandi filiere integrate e allevamenti rurali/piccole realtà produttive, separatamente. I parametri di interesse sono stati stimati come precedentemente descritto.

Analisi filogeografica e determinanti della velocità di diffusione
La migrazione di PRRSV sul territorio italiano dalla sua introduzione al 2021 è stata ricostruita tramite l'approccio filogeografico continuo descritto da Lemey et al. (Lemey et al., 2010). L'insieme degli alberi ottenuti durante la simulazione MCMC è stato utilizzato per valutare l'impatto di diverse variabili ambientali sulla distribuzione dei ceppi e sulla velocità di diffusione utilizzando la libreria *Seraphim* in R (Dellicour et al., 2016). In estrema sintesi, la distanza fra i siti di origine e destinazione dei singoli eventi di migrazione virale e la stima del tempo intercorso fra questi, ha permesso di ricavare la velocità di diffusione, nonché il progressivo incremento dell'areale interessato dall'espansione virale. Inoltre, sono state incluse nell'analisi le caratteristiche territoriali (e.g. variabili climatiche, utilizzo del terreno, densità degli allevamenti, della popolazione animale e umana, della rete stradale, altitudine, ecc.) al fine di indagare la loro correlazione con la velocità di diffusione virale. In altre parole, questo ha permesso di evidenziare e testare formalmente se particolari fattori ostacolassero o favorissero la migrazione di PRRSV durante il suo "passaggio" nel territorio.

RISULTATI

Evoluzione, storia e dinamiche della PRRSV in Italia.
L'analisi filodinamica ha evidenziato un tasso evolutivo elevato, indicativamente 10^{-3} sostituzioni/sito/anno. Dopo l'introduzione dei primi ceppi in Italia, stimata negli anni 80, la popolazione virale ha conosciuto un progressivo aumento sino al 2010, quando e cominciata una marcata diminuzione che è proseguita sino alla fine dello studio, sebbene con una lieve ripresa nel 2015 (Figura 1).

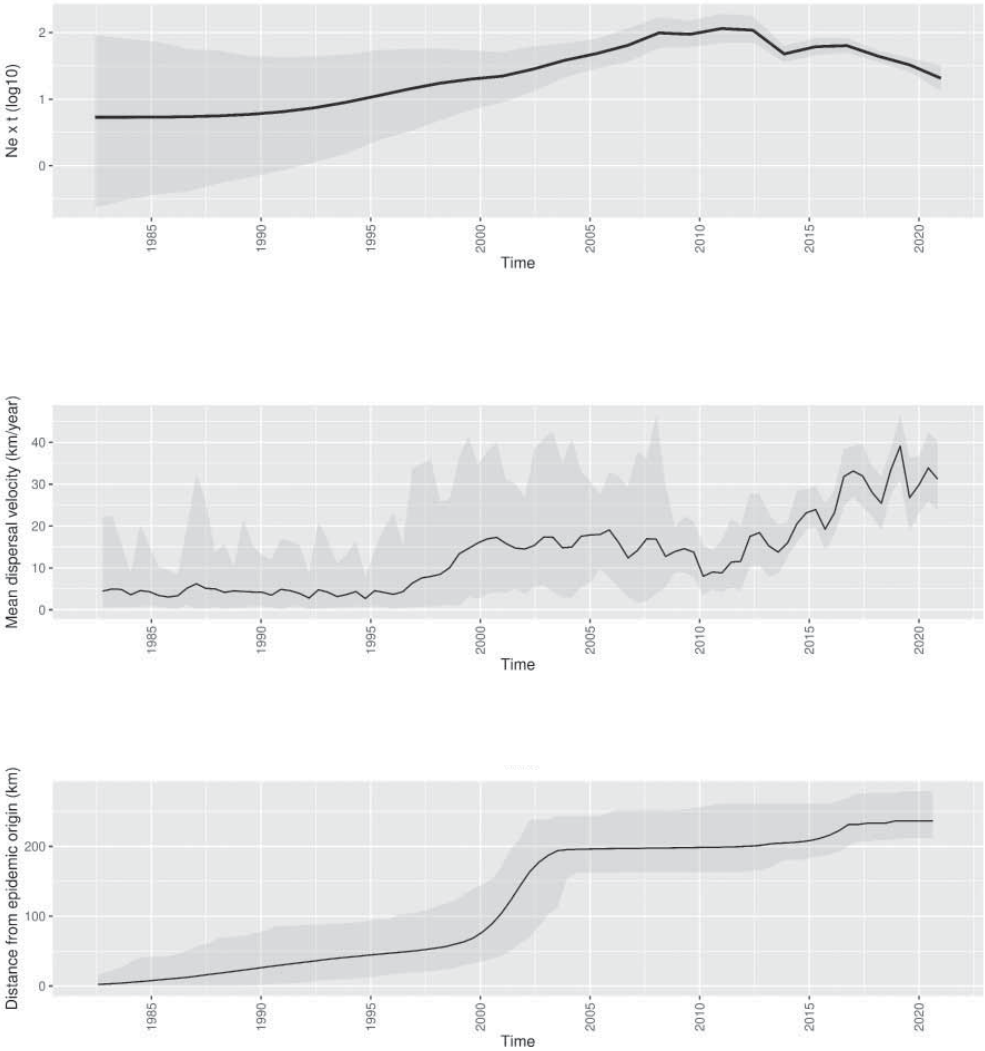


Figura 1. Rappresentazione della variazione nelle dimensioni della popolazione virale (pannello superiore), della velocità di diffusione (pannello centrale) e della distanza dal sito di prima introduzione (pannello inferiore) nel corso del tempo. I valori medi sono rappresentati dalla linea nera mentre l'incertezza nella stima (95HPD) è rappresentata dall'area rossa.

Figure 1. Depiction of relative genetic diversity (upper panel), mean dispersal velocity (middle panel), and distance from the epidemic origin (lower time). Mean values are represented as a black lines, while 95HPD intervals have been displayed as red-shaded areas.

Migrazione dei ceppi fra stadi produttivi
Una chiara direzionalità è stata evidenziata nel flusso virale fra le diverse fasi del processo produttivo. Più nel dettaglio, i tassi di migrazione virale dalle scrofaie agli svezzamenti e dagli svezzamenti agli ingrassi sono risultati rispettivamente 3 e 2 volte più intensi delle altre potenziali connessioni fra siti produttivi. Conseguentemente, pur con limitate eccezioni, il flusso virale seguiva quello dei suini.

Migrazione virale fra flussi produttivi integrati
La stima degli eventi di migrazione virale fra flussi produttivi integrati ne ha dimostrato una sostanziale compartimentalizzazione, come evidenziato dalla tendenza delle cladi dell'albero filogenetico ad includere ceppi campionati in allevamenti appartenenti allo stesso flusso produttivo. Tuttavia, sebbene rari, alcuni eventi di migrazioni fra filiere produttive sono stati identificati e i tassi di migrazione fra queste, sebbene globalmente bassi (pur con alcune eccezioni), sono risultati essere significativamente diversi da zero.
Sorprendentemente, l'analisi del contributo di altre aziende ed allevamenti rurali nell'epidemiologia di PRRSV ha rilevato un importante ruolo di quest'ultimi. Le piccole realtà infatti sembrano albergare una popolazione virale decine di volte superiore a quelle dell'*Azienda* e di altre grandi operatori del settore. Sono inoltre risultate coinvolte nel mediare il trasferimento di ceppi di PRRSV fra diversi flussi integrati dell'*Azienda* (Figura 2).

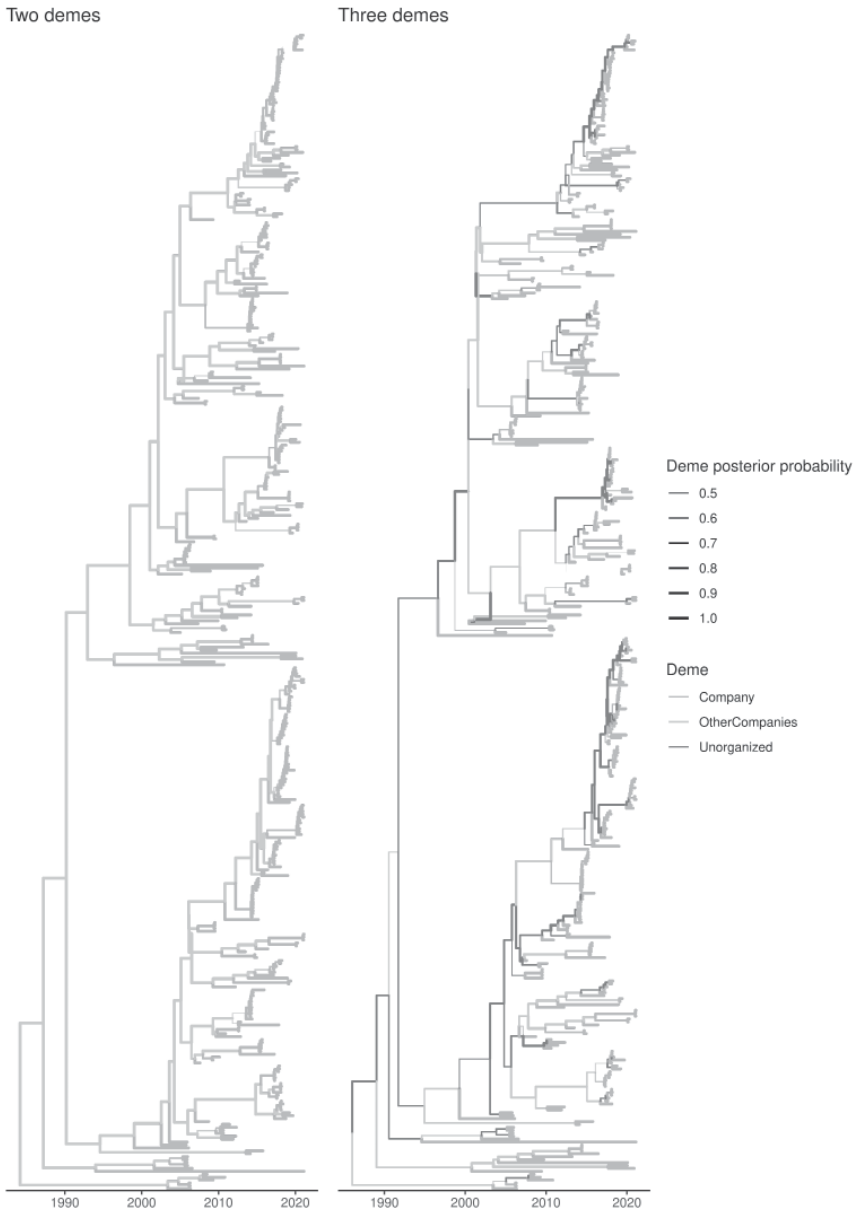


Figura 2. Albero filogenetico rappresentate il passaggio dei ceppi di PRRSV fra diverse realtà produttive. I colori, come riportato in legenda, definiscono il contesto in cui è stata stimata la circolazione degli antenati dei ceppi campionati mentre lo spessore dei rami dell'albero riporta la confidenza in tale stima. L'albero ricostruito includendo l'Azienda e le restanti realtà produttive, e quello in cui queste sono state suddivise in altre grandi filiere integrate e piccoli allevamenti indipendenti e rurali sono riportati rispettivamente nel pannello di sinistra e di desta.

Figure 2. Structured coalescent-based phylogenetic tree of the samples included in the present study. Branch colors, as from legend, mark the inferred company where the ancestral strain was circulating, while branch width represents the posterior confidence of the inference. The trees reconstructed assuming just the Company and all other Italian pig production (left figure) and the one including also a third ghost deme (i.e., Company, other integrated companies, and unorganized/rural farms) (right figure) are reported.

Filogeografia e rilevanza delle caratteristiche del territorio

L'analisi filogeografica suggerisce che l'introduzione e l'iniziale circolazione di PRRSV sia avvenuta nelle regioni centrali del Nord Italia (Lombardia, Emilia Romagna e Veneto), cui è seguita una diffusione centrifuga che ha coinvolto il Friuli Venezia Giulia e più tardivamente Piemonte e Toscana (Figura 3).

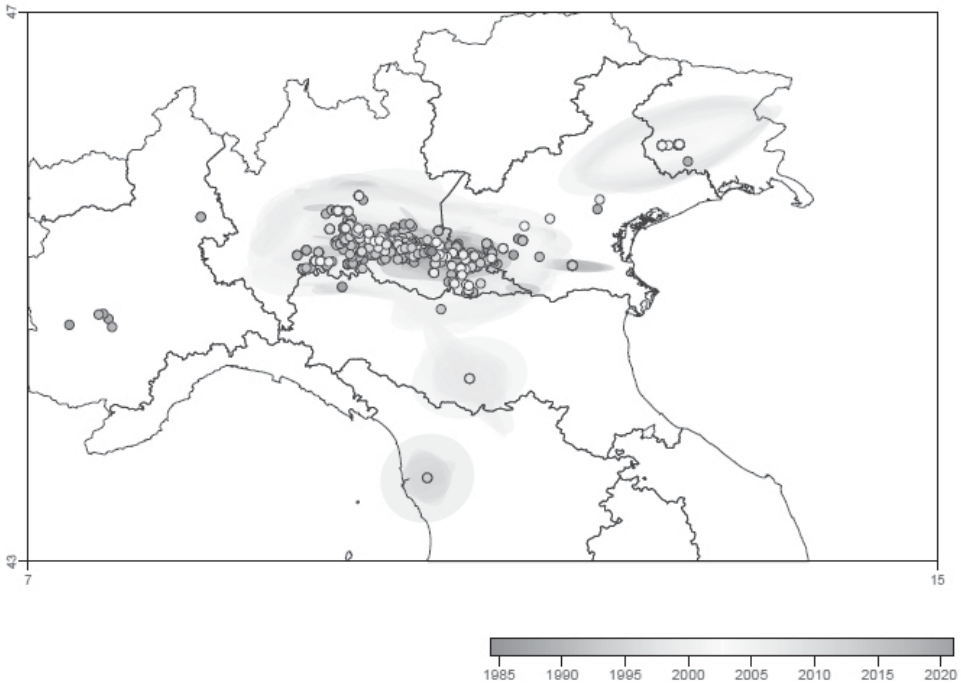


Figura 3. Ricostruzione spazio-temporale della diffusione di PRRSV nel Centro-Nord Italia. I siti di campionamento e quelli dove è stata stimata la presenza degli antenati degli stipiti attuali sono rappresentati come circoli, mentre l'area ombreggiata rappresenta l'incertezza (80%HPD) nella stima. La colorazione riflette la scala temporale in cui sono avvenute le fasi di migrazione, dalla più antica (in rosso) alla più recente (in verde).

Figure 3. Reconstruction of spatio-temporal dispersal history of PRRSV in Central-Northern Italy based on the maximum clade credibility (MCC) trees and 80% HPD regions estimated through the continuous phylogeographic analysis. Nodes of the MCC tree are represented as circles colored according to their time of occurrence (see color-coded scale), and 80% HPD regions were computed for successive time layers and then superimposed using the same color scale reflecting time.

La ricostruzione dell'areale geografico interessato dall'infezione ha mostrato una diffusione relativamente lenta nelle prime 2 decadi successive all'introduzione virale, cui è seguita una più rapida espansione nel periodo 2000-2005 che ha portato al massimo coinvolgimento territoriale (Figura 1). La velocità di diffusione virale ha conosciuto un costante aumento fino al 1995, cui sono seguite 2 fasi di più marcata accelerazione, dal '95 fino agli anni 2000 e dal 2010 alla fine del periodo di studio (Figura 1).
Diverse variabili ambientali sono risultate statisticamente correlate alla distribuzione di PRRSV. In particolare, si è evidenziata una minore tendenza di PRRSV a permanere in aree caratterizzate da alti valori di altitudine, densità della popolazione umana e della rete stradale. Al contrario, aree caratterizzate da un maggiore variabilità climatica nel corso dell'anno e una maggiore densità di suini favoriscono la persistenza virale. È altresì emerso come la densità della rete stradale favorisca la velocità di diffusione virale, mentre elevati valori medi della temperatura annuale la rallenti.

DISCUSSIONE

Quella da PRRSV è probabilmente l'infezione più frustrante per la suinicoltura moderna. Nonostante lo sviluppo e l'applicazione di diversi vaccini e protocolli, nessuno di questi si è rivelato pienamente efficace. Notevoli sforzi sono quindi stati a dedicati a migliorare le misure di biosicurezza e la gestione degli animali, con alterne fortune. L'introduzione di nuovi ceppi ha infatti spesso vanificato i successi temporaneamente ottenuti nella riduzione della prevalenza dell'infezione (Rowland and Morrison, 2012).
Il presente studio indaga la circolazione di PRRSV in Italia e i relativi determinanti, con l'obiettivo di permettere una razionalizzazione e prioritizzazione nell'allocazione delle risorse disponibili.
Sebbene l'introduzione di PRRSV in Italia sia stata stimata indicativamente negli anni '80, va tenuto a mente che tale valore si riferisce all'antenato comune dei ceppi che è stato effettivamente possibile campionare. Non è quindi da escludere che PRRSV abbia circolato in Italia anche in precedentemente, coinvolgendo realtà produttive diverse dall'*Azienda*, o siano esistite varianti estintesi prima dell'inizio del campionamento.
A prescindere da queste speculazioni, il successivo pattern di diffusione appare chiaro. Dopo l'iniziale introduzione nel centro del Nord Italia, PRRSV ha conosciuto una diffusione centrifuga, interessando, come atteso, aree con maggiore vocazione agricola (i.e. aree a elevata densità di suini, uso agricolo del terreno, bassa densità della popolazione umana e della rete stradale). Studi precedentemente effettuati negli USA avevano evidenziato un'analoga associazione (Arruda et al., 2017; Jara et al., 2021; Makau et al., 2021). La diffusione virale, inizialmente relativamente lenta, ha poi conosciuto una rapida espansione dalla metà degli anni '90, comportante fra le altre cose il raggiungimento dell'areale massimo. Tale incremento rispecchia l'espansone commerciale dell'*Azienda* che, negli stessi anni, ha acquisito diversi nuovi allevamenti in varie aree del Nord Italia. Il conseguente incremento nella movimentazione animale e delle distanze fra allevamenti può giustificare l'incremento del territorio interessato e della velocità di diffusione.
In modo più inatteso, dopo il raggiungimento della massima espansione, il virus ha continuato a diffondere ad una velocità comparabile, se non più elevata di quella precedente. Sebbene questo testimoni i limiti delle misure di controllo e biosicurezza attualmente adottate, il fenomeno è in parte spiegabile con l'organizzazione gerarchica dell'azienda, in cui un numero limitato di scrofaie distribuisce animali a diversi svezzatori, a loro volta fornitori di vari ingrassi localizzati in diverse regioni del territorio nazionale. La rapida diffusione del virus su lunghe distanze sarebbe quindi da attribuire all'associazione fra il flusso di suini e quello virale, come dimostrato nel presente ed in altri studi. Mentre la diffusione virale

“entro-flusso” produttivo era in parte attesa e difficilmente prevenibile, più complessa è la valutazione dell’efficacia delle misure intraprese per prevenire il passaggio di ceppi “fra-flussi produttivi”. L’analisi dell’albero filogenetico ha rivelato una chiara tendenza dei ceppi campionati in allevamenti della stessa catena produttiva a clusterizzare assieme, dimostrando la sostanziale efficacia di questa organizzazione come misura di controllo. Tuttavia, diverse eccezioni sono emerse e la stima dei tassi di migrazione è risultata statisticamente diversa da zero per diverse coppie di filiere. Appare quindi rinforzata la rilevanza della diffusione laterale di PRRSV fra flussi produttivi e la difficoltà nel limitarla, nonostante gli sforzi e le risorse dedicate (Makau et al., 2021). Una condivisione, anche parziale, dei servizi (veterinari, tecnici, autotrasporti, ecc) risulta inevitabile da un punto di vista pratico e contribuisce al rischio di introduzione di nuovi stipiti tramite la movimentazione animale e di fomiti. Ciò concorda con il ruolo della densità della rete stradale, emersa come fattore favorente le velocità di diffusione virale, e conferma ulteriormente la rilevanza dei contatti indiretti come fattore di rischio di primaria importanza nell’ostacolare il controllo di PRRSV e in particolare la sua eradicazione (Makau et al., 2021). È interessante notare come, a differenza di quanto osservato nel medesimo territorio per il coronavirus aviare, la densità animale non appaia condizionare la velocità di diffusione virale. La trasmissione aerogena, sebbene dimostrata in precedenza (Otake et al., 2010), sembra quindi giocare un ruolo secondario nel contesto indagato. Se questo sia legato alla struttura dell’allevamento italiano (dimensioni medie dell’allevamento, struttura, aereazione, ecc), a fattori ambientali o a peculiarità locali, e quanto queste evidenze siano generalizzabili ad altri contesti richiederà ulteriori studi.

Al contrario, similmente a quanto riportato nel contesto avicolo, allevamenti esterni alla filiera, ed in particolare piccole realtà indipendenti e rurali, sembrano svolgere un ruolo di mediazione nel passaggio di stipiti virali da un flusso produttivo all’altro, nonché nel mantenimento di un elevata popolazione virale, e quindi di una rilevante pressione infettante (Franzo et al., 2020). Probabilmente, le ridotte risorse manageriali, economiche e logistiche comportano una minore capacità di queste realtà nel controllare l’infezione e la sua diffusione. Di contro, il riscontro che la popolazione virale stimata nell’*Azienda* sia proporzionalmente inferiore rispetto alla quota di suini allevata, suggerisce come le misure adottate da realtà produttive altamente organizzate permettano di ridurre con maggiore efficacia la presenza e prevalenza di PRRSV.

In tal senso, a partire dal 2010 le dimensioni della popolazione virale hanno evidenziato un progressivo declino. Anche in questo caso una scelta manageriale potrebbe essere uno dei determinanti. Negli stessi anni, infatti, *l’Azienda* ha iniziato una campagna focalizzata sull’acclimatamento delle scrofette tramite esposizione forzata ai ceppi di campo, da affiancare al tradizionale uso della vaccinazione. Si può quindi ipotizzare che questo protocollo di immunizzazione intensivo abbia avuto un grosso impatto sulla circolazione virale, specie nelle prime fasi di vita e quindi nei successivi siti della catena produttiva.

Tuttavia, in considerazione del contesto epidemiologico complessivo, appare evidente che per aspirare ad un controllo realmente efficace si renda necessaria un’azione che coinvolga gli allevamenti di una vasta regione e si basi su una fattiva collaborazione fra i vari allevamenti e operatori del settore (Rowland and Morrison, 2012).

Una più intensa attività diagnostica e di sequenziamento appare fondamentale per migliorare la conoscenza del contesto epidemiologico italiano. I dati qui riportati infatti, per quanto analizzati con un robusto approccio statistico, originano da una sola azienda integrata, caratterizzata da un elevato livello gestionale. L’inferenza dei risultati ottenuti ad altri contesti, probabilmente accurata nel caso di altre grandi realtà produttive, è invece rischiosa nel caso di enti minori, in parte localizzati in altre aree quali in centro-sud Italia, e dovrebbe essere sostanziata da ulteriori evidenze empiriche.

Infine, il presente studio ha permesso di evidenziare il ruolo di diverse variabili ambientali e climatiche nel condizionare la persistenza e diffusione di PRRSV. In particolare, basse temperature e un'elevata variabilità nel corso dell'anno sono state positivamente associate alla persistenza e circolazione virale, probabilmente in quanto queste condizioni agiscono indirettamente incrementando la suscettibilità dell'ospite e/o la resistenza del virus nell'ambiente. Al contrario, un'elevata altitudine sarebbe associata ad una minor presenza di stipiti di PRRSV, giustificando la tendenza a localizzare in aree più elevate le strutture dedicate all'allevamento dei soggetti di maggior pregio.

CONCLUSIONI

Complessivamente, i risultati di questo studio dimostrano come diversi fattori modellino l'epidemiologia di PRRSV in Italia. La gestione degli animali, ed in particolare i protocolli di immunizzazione e la separazione dei flussi animali si sono dimostrati efficaci nel limitare le dimensioni della popolazione virale. Questo si ripercuote sull'evidente vantaggio delle grandi filiere organizzate rispetto alle realtà minori, le quali possono rappresentare una minaccia per il sistema nel suo complesso. Tuttavia, una completa prevenzione della circolazione e trasmissione virale è risultata impossibile anche nel contesto dell'*Azienda* indagata e diversi altri fattori, climatici e ambientali, contribuiscono nel determinare il rischio epidemiologico complessivo. Sulla base dell'intricato network di interazioni fra diverse variabili, appare chiaro come un efficace controllo della PRRSV possa essere ricercato solamente con un approccio multidisciplinare che agisca a diversi livelli e veda la collaborazione delle varie realtà e operatori del settore.

BIBLIOGRAFIA

1. Arruda, A.G., Vilalta, C., Perez, A., Morrison, R., 2017. Land altitude, slope, and coverage as risk factors for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) outbreaks in the United States. PLOS ONE 12, e0172638.
2. Chae, C., 2021. Commercial prrs modified-live virus vaccines. Vaccines. 9, 185
3. Chand, R.J., Trible, B.R., Rowland, R.R.R., 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Current Opinion in Virology 2, 256–263.
4. Corzo, C.A., Mondaca, E., Wayne, S., Torremorell, M., Dee, S., Davies, P., Morrison, R.B., 2010. Control and elimination of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Virus Research 154, 185–192.
5. de Maio, N., Wu, C.H., O'Reilly, K.M., Wilson, D., 2015. New Routes to Phylogeography: A Bayesian Structured Coalescent Approximation. PLoS Genetics 11, e1005421.
6. Dellicour, S., Rose, R., Faria, N.R., Lemey, P., Pybus, O.G., 2016. SERAPHIM: Studying environmental rasters and phylogenetically informed movements. Bioinformatics 32, 3204–3206.
7. Dokland, T., 2010. The structural biology of PRRSV. Virus Research 154, 86.
8. Franzo, G., Dotto, G., Cecchinato, M., Pasotto, D., Martini, M., Drigo, M., Franzo G, Dotto G, Cecchinato M, Pasotto D, Martini M, Drigo M, 2015. Phylodynamic analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Italy: Action of selective pressures and interactions between different clades. Infection, Genetics and Evolution 31, 149–157.
9. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Moreno, A., Legnardi, M., Massi, P., Tosi, G., Trogu, T., Ceruti, R., Pesente, P., Ortali, G., Gavazzi, L., Cecchinato, M., 2020. Phylodynamic analysis and evaluation of the balance between anthropic and environmental factors affecting IBV spreading among Italian poultry farms. Scientific Reports 10, 1–11.

10. Jara, M., Rasmussen, D.A., Corzo, C.A., Machado, G., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus dissemination across pig production systems in the United States. Transboundary and Emerging Diseases 68, 667–683.
11. Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J., Suchard, M.A., 2010. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. Molecular Biology and Evolution 27, 1877–1885.
12. Makau, D.N., Alkhamis, M.A., Paploski, I. a. D., Corzo, C.A., Lycett, S., VanderWaal, K., 2021. Integrating animal movements with phylogeography to model the spread of PRRSV in the USA. Virus Evolution 7, 1–11.
13. Nguyen, L.T., Schmidt, H.A., von Haeseler, A., Minh, B.Q., 2015. IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. Molecular Biology and Evolution 32, 268–274.
14. Otake, S., Dee, S., Corzo, C., Oliveira, S., Deen, J., 2010. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and Mycoplasma hyopneumoniae from a swine population infected with multiple viral variants. Veterinary Microbiology 145, 198–208.
15. Rambaut, A., Lam, T.T., Max Carvalho, L., Pybus, O.G., 2016. Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). Virus Evolution 2, vew007.
16. Rowland, R.R.R., Morrison, R.B., 2012. Challenges and Opportunities for the Control and Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. Transboundary and Emerging Diseases 59, 55–59.
17. Suchard, M.A., Lemey, P., Baele, G., Ayres, D.L., Drummond, A.J., Rambaut, A., 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. Virus Evolution 4,1 vey016.
18. Zhou, L., Ge, X., Yang, H., 2021. Porcine reproductive and respiratory syndrome modified live virus vaccine: A “leaky” vaccine with debatable efficacy and safety. Vaccines. 2021, 9, 362

VERIFICA DELLA PRESENZA DI ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN SUINI REGOLARMENTE MACELLATI IN FRIULI VENEZIA GIULIA E PROVINCIA AUTONOMA DI BOLZANO

PRESENCE OF ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE IN SLAUGHTERED SWINE IN FRIULI VENEZIA GIULIA REGIONE AND BOLZANO PROVINCE

USTULIN M., COLORIO S., TARGHETTA C., FERINO L., IDRIZI I., LA SPISA M., VIO D.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Parole chiave: Mal rosso, suino, MIC
Keywords: erysipelas, swine, MIC

RIASSUNTO

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) l'agente eziologico del Mal Rosso del suino, può infettare anche altre specie animali causando tra le altre, forme setticemiche. Inoltre è un agente di zoonosi che interessa categorie professionali collegate ai suini ed alla suinicoltura in generale.
Nel suino la malattia è controllata tramite la vaccinazione nei riproduttori e la terapia antibiotica di eventuali forme cliniche; i soggetti con forme evidenti di Mal Rosso sono esclusi dalla macellazione e le relative carcasse, come previsto dalla normativa, destinate alla distruzione. È tuttavia possibile che soggetti con forme inapparenti che albergano il patogeno a livello di tonsille, intestino o cute, arrivino alla macellazione.
A seguito di un monitoraggio su soggetti macellati si è evidenziata una percentuale di soggetti positivi alle analisi biomolecolari del 16,04% in Friuli Venezia Giulia e del 46,2% Nella Provincia Autonoma di Bolzano.
Da 20 soggetti positivi in PCR sono stati isolati ceppi di ER che sono stati sottoposti a determinazione della MIC e dello Spa-Type, evidenziando una netta prevalenza di SpaA e di ceppi sensibili alle penicilline, terapia solitamente utilizzata per la cura del Mal Rosso.

ABSTRACT

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) is the aetiological agent of swine erisypelas, but it can cause diseases in other animal species and erysipeloid in human, too.
The clinical pathology is usually kept under control by vaccination of sows and antibiotic therapy in clinical cases. Anyway, it is possible that animals without symptoms but hosting ER on tonsils, intestines or skin can be regularly slaughtered.
A monitoring at slaughterhouse showed positivity by PCR in 16,04% of swine slaughtered in Friuli Venezia Giulia Region and in 46,2% of swine slaughtered in Bolzano Province.
On samples collected from 20 animals ER strains were isolated and furthered characterized. Spa type determination showed clear prevalence of SpaA type and MIC determination showed that sensitivity to penicillin and ampicillin is still common.

INTRODUZIONE

Erysipelotrix rhusiopathiae (ER) è un germe ubiquitario, capace di infettare numerose specie animali e l'uomo. Il serbatoio più importante è rappresentato dai suini. Negli

allevamenti di suini è presente a livello ambientale (feci, liquami, acqua di derivazione e scolo) e può essere isolato da feci e tonsille di animali portatori.
L'infezione nel maiale causa il Mal Rosso o Mal Rossino, malattia infettiva a decorso solitamente acuto che si manifesta in una forma setticemica con ipertermia, iperemia cutanea e splenomeglia; può inoltre provocare l'aborto nelle scrofe gravide. Nella fase acuta e nella forma subacuta dell'infezione è presente anche una forma esantematica con la comparsa di chiazze ben delimitate (esantema a mattone "diamond shaped") sui fianchi e sul dorso degli animali colpiti. In forma cronica è causa di endocarditi, per lo più vegetative, e artrosinoviti. Le scrofe vengono regolarmente vaccinate per ER per limitare le forme abortigene; la vaccinazione non è invece applicata ai suini da ingrasso, che possono essere così interessati da forme acute e subacute. Per il trattamento di eventuali forme cliniche si ricorre in questi casi alla terapia antimicrobica (Opriessning *et al*., 2012).
L'infezione da ER nell'uomo causa l'erisipeloide, patologia cutanea (cellulite localizzata) che può sfociare in forme endocardiche e artritiche e più raramente in forme setticemiche acute. La maggior parte dei casi di erisipela nell'uomo è epidemiologicamente legata al suino; le categorie professionali più esposte al rischio sono gli operatori degli stabilimenti di macellazione e di lavorazione delle carni, seguiti dagli operatori delle aziende suinicole. I suini con forme cliniche evidenti sono esclusi dalla macellazione; soggetti con forme inapparenti, regolarmente macellati, albergano l'agente a livello di tonsille, intestino e cute. La trasmissione dell'infezione all'uomo avviene tramite soluzioni di continuo della cute o per via alimentare ((Brooke e Riley, 1999).
Nel suino, la diagnosi delle forme cliniche conclamate è affidata all'isolamento batteriologico di ER da campioni di organo, metodica robusta in ragione delle alte cariche batteriche nelle forme setticemiche; per l'isolamento nelle forme croniche o inapparenti è necessario il ricorso a terreni di arricchimento in ragione della bassa carica batterica nel campione.
I dati di prevalenza dell'infezione inapparente nei suini macellati in Italia sono pressoché assenti o limitati a studi eseguiti su un numero limitato di campioni; non sono disponibili dati di tipizzazione molecolare dei ceppi isolati né dati relativi all'antimicrobicoresistenza (AMR) di ER.
Lo scopo del monitoraggio è stato quello di verificare la prevalenza di suini portatori sani di ER tra quelli regolarmente macellati in Friuli Venezia Giulia (FVG) e Provincia Autonoma di Bolzano.

MATERIALI E METODI

Il protocollo di campionamento è stato stabilito al fine di stimare la prevalenza di malattia al macello e ha previsto la raccolta di campioni di cute (tramite spongebag), feci e tonsille campionando 7 animali a settimana per 16 settimane. I campionamenti sono stati suddivisi tra due macelli in FVG e altrettanti nella Provincia Autonoma di Bolzano.
Per ciascun campione è stata prevista una prima fase di prearricchimento tramite semina Tryptone Soy Broth (TSB) e incubazione a 37°C per 18-24 ore. Da un'aliquota di prearricchito è stato estratto il DNA utilizzando il kit MagMax Core sull'estrattore automatico King Fisher Flex. Gli estratti sono stati sottoposti a screening secondo la metodica Real Time PCR descritta da Pal *et al*. (2009) che prevede l'utilizzo di primer comuni alle specie di Erysipelothrix spp. e una sonda specifica per ER che garantisce elevata specificità.
Dai campioni risultati positivi all'analisi biomolecolare sono proseguite le indagini microbiologiche per tentare l'isolamento del microrganismo.
Il protocollo di isolamento associa l'uso di terreni selettivi e non selettivi e di diverse

condizioni di incubazione, per aumentare le probabilità di isolamento dei ceppi di ER.
Nello specifico, si è proceduto a inoculare 1 ml brodo di prearricchimento in 9 ml di brodo selettivo, TSB addizionato con Kanamicina e Gentamicina (TSB+K+G) e, al tempo stesso, a seminare lo stesso prearricchito su due piastre di Agar Sangue (AS). Il TSB+K+G e una delle piastre di AS sono stati incubati a 37°C per 24 ore in aerobiosi, la seconda piastra di AS in microareofilia (5% di CO_2).
Dopo 24 ore di incubazione, si è proceduto a inoculare 100 µl di TSB+K+G su due piastre di AS e altrettanti su due piastre di Tryptone Soy Agar addizionato con Kanamicina e Gentamicina (TSA+K+G). Di ciascun terreno una piastra è stata incubata a 37°C per 24 ore in microaerofilia e una in aerobiosi (Colavita *et al.,* 2006).
Tutte le piastre di AS e TSA+K+G sono state lette dopo 24 e 48 ore di incubazione per verificare la presenza di colonie con morfologia riferibile a ER. Da eventuali colonie sospette si è proseguito con isolamento e identificazione.
I ceppi isolati sono stati poi sottoposti a determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) e dello Spa-type.
La MIC è stata determinata con metodo della microdiluizione in brodo, con l'aggiunta di un indicatore di pH, il Rosso Fenolo allo 0,2%, per facilitare la lettura delle micropiastre.
Lo Spa-type è stato determinato tramite real time PCR effettuato sul DNA del ceppo batterico (Shen *et al*. 2010).

RISULTATI

Per la Regione FVG sono stati analizzati campioni di 106 suini, di cui 17 sono risultati positivi per almeno una delle matrici prelevate ovvero 16,04%.
Nel dettaglio, sono risultate positive le tonsille di 11 animali, la cute di 10 animali e un solo campione di feci. 3 soggetti sono risultati positivi su 2 matrici e 1 su 3. Da nessuno dei campioni analizzati è stati solato un ceppo di ER.
Per la Provincia Autonoma di Bolzano sono stati analizzati campioni di 104 suini di cui 48 sono risultati positivi per almeno una delle matrici prelevate per una prevalenza ovvero il 46,2%.
Nel dettaglio, sono risultate positive le tonsille di 40 animali, la cute di 27 animali e 13 campioni di feci. 16 soggetti sono risultati positivi su 2 matrici e 8 su 3.
Nessun ceppo di ER è stato isolato dei campioni prelevati in FVG, mentre sono stai isolati 20 ceppi provenienti da animali macellati a Bolzano.
I ceppi sono stati ulteriormente caratterizzati andando a determinare lo Spa-type. 19 ceppi sono stati identificati come SpaA, il sottotipo più frequente, mentre l'ultimo è rimasto indeterminato.
13 ceppi sono stati sottoposti a determinazione della MIC, i risultati sono riassunti in tabella 1.

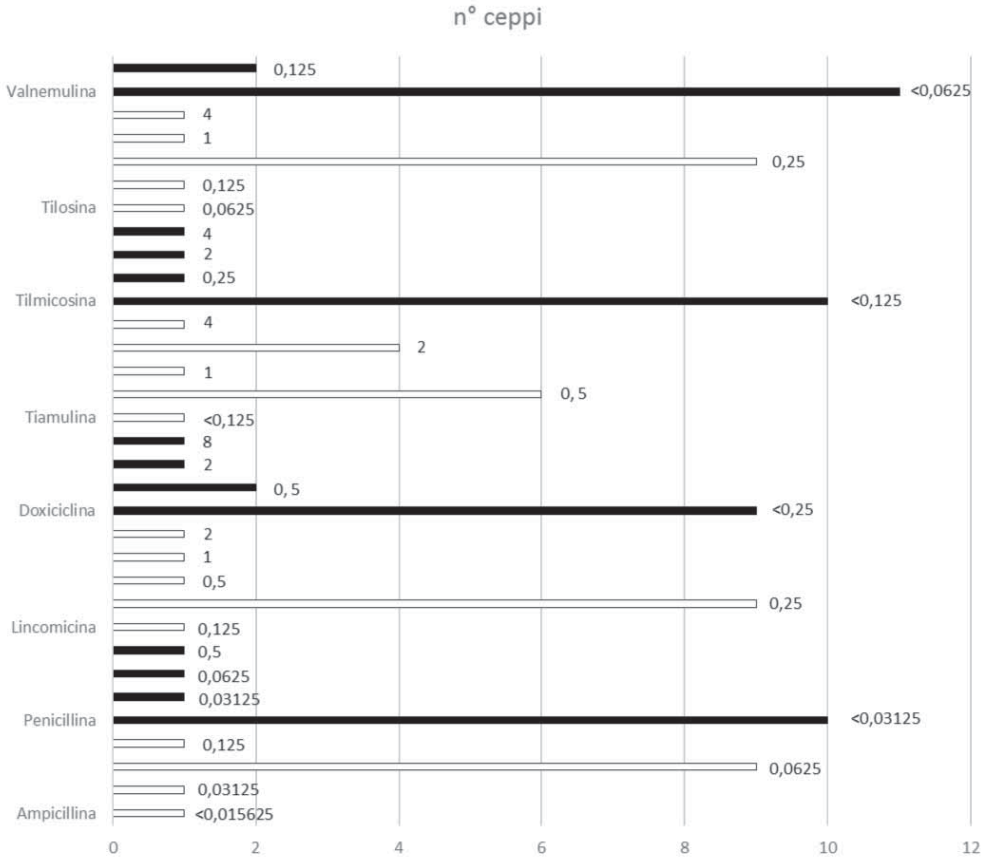


Tabella 1: Esiti MIC
Table 1: MIC results

DISCUSSIONE

I risultati del presente monitoraggio hanno evidenziato una percentuale modesta di portatori sani in FVG ed una più consistente in provincia di Bolzano. I fattori che possono influenzare la prevalenza di questo microrganismo sono numerosi e includono caratteristiche degli allevamenti e di management che andranno approfondite. È però già noto che il sistema di allevamento in FVG include allevamenti di dimensioni maggiori rispetto a quelli presenti nel territorio della Provincia Autonoma di Bolzano, dove l'allevamento del suino è distribuito in allevamenti di piccole dimensioni votati prevalentemente al consumo familiare oppure alla produzione di salumi consumati localmente.

Un dato interessante è che la quasi totalità dei ceppi isolati presenta come antigene di superficie lo SpaA. Gli antigeni protettivi di superficie (spa) di *Erysipelothrix spp* sono associati alla virulenza del ceppo e determinano risposta anticorpale in corso di infezione (Ingebritson *et al*., 2010). Dati sperimentali di immunizzazione su topi, hanno evidenziato protezione completa verso ceppi con spa-type omologo e parziale verso ceppi con diverso spa-type.

SpaA è la proteina di superficie prodotta dai sierotipi 1a, 1b, 2, 5, 8, 9, 12, 15, 16, 17 ed N,

SpaB viene prodotta dai sierotipi 4, 6, 11, 19 e 21 mentre SpaC viene prodotta da sierotipo 18 (McNeal *et al*., 2017).
Considerato che i vaccini disponibili in commercio sono prodotti con ceppi di sierotipi 1 e/o 2, la prevalenza netta di ceppi dello stesso spa-type può essere considerata suggestiva di una buona efficacia dei vaccini disponibili sui ceppi circolanti, considerato anche il fatto che nessuno di questi ceppi sia stato isolato da animali sintomatici.
Per quanto concerne i profili di AMR, sulla base Break point (BP) descritti nel CLSIVET06, possiamo stabilire che 12 su 13 ceppi sono risultati sensibili alla penicillina (BP S ≤ 0,12) e 13 ceppi su 13 ad ampicillina (BP S ≤ 0,25). Nei casi clinici di Mal Rosso le penicilline sono i farmaci di elezione, per cui abbiamo potuto verificare diffusa sensibilità tra i ceppi circolanti.
Non essendo disponibili i BP specifici per lincomicina, sono stati utilizzati i BP per la clindamicina (BP S ≤ 0,25; I=0,5; R≥1), farmaco appartenente alla stessa famiglia (lincosamidi). Sulla base di tali BP possiamo classificare 10 ceppi sensibili come "sensibili", 1 come "intermedio" e 2 come "resistenti".
Come considerazione generale, il fatto che per la maggior parte dei principi attivi analizzati presentino valori di MIC inferiori alla più bassa concentrazione testata è da considerarsi favorevole in merito alla sensibilità dei ceppi isolati verso le principali molecole antimicrobiche anche in assenza di BP ufficiali.

CONCLUSIONI

Nonostante la patologia clinica sia un evento poco comune e la vaccinazione, in particolare nelle scrofe, un intervento di routine, la presenza di animali portatori sani non va trascurata, soprattutto in funzione del fatto che ER sia un agente di zoonosi.
Attenzione va posta anche al fatto che la generale riduzione dell'utilizzo di antimicrobici a scopo metafilattico negli allevamenti potrebbe favorire la diffusione di questo batterio.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 17/18 "Approccio diagnostico integrato per la ricerca, caratterizzazione biomolecolare e la determinazione del profilo di antibioticoresistenza di *Erysipelothrix rhusiopathiae* in suini regolarmente macellati nel Nord-est italiano" finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Brooke C.J., Riley T.V., Erysipelothrix rhusiopathiae: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. J Med Microbiol 1999 Sep;48(9):789-799. doi: 10.1099/00222615-48-9-789
2. CLSI VET 06, Methods for Antimicrobial susceptibility testing of Infrequently Isolated or Fastidiuos Bacteria Isolated from Animals. 1st Edition
3. Colavita, G., Vergara, A., & Ianieri, A. (2006). Deferment of slaughtering in swine affected by cutaneous erysipelas. Meat Sci., 72(2), 203–205.
4. Ingebritson A. L , Roth J. A, Hauer . Erysipelothrix rhusiopathiae: association of Spa-type with serotype and role in protective immunity. Vaccine 2010 Mar 16;28(13):2490-6. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.01.041. Epub 2010 Jan 29.
5. McNeil, M., Gerber, P.F., Thomson, J., Williamson S., Opriessnig T. (2017). Serotypes and Spa types of Erysipelothrix rhusiopathiae isolates from British pigs (1987 to 2015). The Veterinary Journal, 225, 13-15.
6. Opriessnig, T., & Wood, R. L. (2012). Erysipelas. In G. W. S. Jeffrey J. Zimmerman, Locke A. Karriker, Alejandro Ramirez, Kent J. Schwartz (Ed.), Disease of swine (10 th, pp. 750–759). John Wiley & Sons.

7. Shen H.G., J.S. Bender and T. Opriessnig (2010) Identification of surface protective antigen (spa) types in Erysipelothrix reference strains and diagnostic samples by spa multiplex real-time and conventional PCR assays. Journal of Applied Microbiology, 109 1227–1233
8. N. Pal, J.S. Bender and T. Opriessnig. Rapid detection and differentiation of Erysipelothrix spp. by a novel multiplex real-time PCR assay. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04560.x

VALUTAZIONE PRELIMINARE DI UN PROTOCOLLO DI VACCINAZIONE PRECOCE CON VACCINO STABULOGENO CONTRO STREPTOCOCCUS SUIS

PRELIMINARY DATA ON PRECOCIUOS VACCINATION PROTOCOL AGAINST STREPTOCOCCUS SUIS WITH AUTOLOGOUS VACCINE

USTULIN M.[1], GIORGIUTTI M.[2], GAGLIAZZO L.[1], PANICCIA' M.[3], CUCCO L.[3], SEVERI G.[3], TAGLIENTE D.[1], GHIRITI A.[1], VIO D.[1]

[1] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*
[2] *Libero professionista*
[3] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche*

Parole chiave: *Streptococcus suis*, vaccino stabulogeno
Keywords: *Streptococcus suis*, autologous vaccines

RIASSUNTO

Streptococcus suis (*S. suis*) è uno dei più importanti patogeni del suino, in grado di causare setticemia, meningite, artrite in suinetti svezzati, è inoltre agente di zoonosi occupazionale.
S. suis è una specie batterica che presenta un'elevata variabilità fenotipica e genotipica; più capsulotipi, indistinguibili fenotipicamente, possono circolare nello stesso allevamento. L'utilizzo, nelle scrofe e nei suinetti in svezzamento, di vaccini stabulogeni ha mostrato efficacia variabile nel contenimento delle forme cliniche. Il presente lavoro descrive l'applicazione di un protocollo di vaccinazione precoce per il controllo della mortalità e della sintomatologia da *S. suis*.

ABSTRACT

Streptococcus suis (*S. suis*) is one of the most important swine pathogens and can be agent of septicemia, meningitis and arthritis in weaned piglets. Moreover, it is agent of zoonosis in professions connected to swine industry.
S. suis is a bacterial species with a high genetic and phenotypic variability, various capsulotypes can circulate in a single farm. Autologous vaccines, used on sows and weaned piglets, have not shown constant efficacy.
In the present work a precocious vaccination have shown to be able to prevent nervous signs and death in piglets.

INTRODUZIONE

Streptococcus suis (*S. suis*) è uno dei più importanti patogeni del suino, in grado di causare setticemia, meningite, artrite in suinetti svezzati. *S. suis* è inoltre agente di zoonosi occupazionale per operatori di allevamenti, macelli e laboratori di sezionamento nei quali può determinare meningite, setticemia ed endocardite (Mancini *et al*., 2016).
S. suis è una specie batterica che presenta un'elevata variabilità fenotipica e genotipica; sono infatti noti 33 sierotipi e circa 150 fattori di virulenza (Segura *et al*., 2017; Haas *et al.,* 2018), sono descritti casi in cui capsulotipi diversi, patogeni ed apatogeni, non distinguibili fenotipicamente, possono circolare contemporaneamente nello stesso allevamento. Il controllo delle patologie da *S. suis* avviene prevalentemente tramite terapia antibiotica ed in

caso di incidenza elevata, sono necessarie terapie di gruppo *per os*. È inoltre disponibile un vaccino commerciale rivolto contro il capsulotipo 2.
Una delle opzioni disponibili per il controllo delle patologie causate da *S suis* prevede il ricorso all'utilizzo di vaccini stabulogeni, che però presenta efficacia variabile, presumibilmente correlata alla elevata variabilità fenotipica del patogeno e ai criteri di scelta dei ceppi da destinare alla produzione del vaccino (Rieckmann *et al*., 2020; Segura *et al*., 2015).
Il protocollo usualmente previsto per gli interventi con un vaccino stabulogeno prevede la vaccinazione delle scrofe alla quinta e alla seconda settimana prima del parto ed è inoltre possibile effettuare interventi vaccinali anche su animali in svezzamento in base alla situazione epidemiologica.
Nel presente caso, in un allevamento con insorgenza precoce di sintomatologia clinica da *S. suis* si è valutato un protocollo di vaccinazione precoce nei suinetti sull'incidenza di mortalità e sintomatologia clinica.

MATERIALI E METODI

Il presente studio ha coinvolto un allevamento da riproduzione a ciclo aperto, con circa 1200 scrofe in produzione, con una storia clinica riferibile a casi di streptococcosi precoce, verificata con indagini di laboratorio
L'azienda ha iniziato a vaccinare le scrofe nel 2017 con un vaccino stabulogeno prodotto con ceppi aziendali appartenenti al sierotipo capsulare 2.
Nel corso del 2021, un aumento della casistica di mortalità improvvisa e di soggetti con sintomatologia nervosa in svezzamento ha spinto l'azienda a procedere con approfondimenti diagnostici.
A seguito di indagini anatomopatologiche e batteriologiche, il sospetto di streptococcosi è stato confermato tramite l'isolamento del ceppo batterico dal cervello di 5 soggetti svezzati di circa 30-35 giorni di età, pervenuti presso la Sezione di Pordenone dell'IZSVe in tre diversi conferimenti nel mese di agosto. I ceppi isolati dal recente focolaio, unitamente ad altri tre ceppi isolati precedentemente da soggetti con forma clinica nel 2020 e nel 2021 sono stati sottoposti a caratterizzazione molecolare presso la sezione di Fermo dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM). I ceppi sono stati sottoposti alla determinazione tramite PCR sierotipo capsulare (Okura et al., 2014) di appartenenza e alla ricerca dei principali geni di virulenza, ovvero *mrp*, *sly*, *ef* (Silva L. et al., 2006, King et al.,2001 e Wisselink et al., 1999). Tali ceppi si sono confermati tutti appartenere al capsulotipo 9 e positivi per i fattori di virulenza *sly* e *mrp*.
È stato quindi allestito dall'Officina Farmaceutica dell'IZSUM un vaccino stabulogeno bivalente che includesse, oltre al ceppo di capsulotipo 2 già utilizzato per i precedenti allestimenti, anche un ceppo isolato e caratterizzato nel recente periodo appartenente al capsulotipo 9. Come adiuvante è stato utilizzato un adiuvante a nanoparticelle, il Montanide IMS 1313 nel rapporto 20% v/v.
Tenuto conto della precocità delle manifestazioni cliniche, il veterinario aziendale, di concerto con la proprietà, hanno deciso di non somministare il vaccino alle scrofe durante la gravidanza e procedere alla somministrazione del vaccino stabulogeno in età precoce con una prima vaccinazione a tre giorni di vita con richiamo a 24 giorni.
Tale protocollo di vaccinazione sperimentale è stato eseguito in due repliche, su una banda di svezzamento a dicembre 2021 e una a gennaio 2022; per ogni banda metà dei soggetti sono stati vaccinati e tenuti separati dalla restante parte di suinetti non vaccinati (studio caso controllo), in questo modo è stato possibile verificare la presenza di differenze significative nei due gruppi in termini di mortalità, soggetti con sintomatologia nervosa e trattamenti antibiotici di gruppo. Ogni gruppo ha incluso 240 soggetti vaccinati e 240 soggetti non vaccinati.

La significatività dei dati è stata valutata tramite il test esatto di Fisher (IC 95%).
Sono stati inoltre raccolti dati anamnestici riguardanti concomitanti patologie nel periodo interessato.

RISULTATI

	Prova Nati Dicembre				Prova Nati Gennaio			
	Vaccinati		Non Vaccinati		Vaccinati		Non Vaccinati	
Numero soggetti	240		240		240		240	
Morti	3		10		7		8	
% Mortalità	1.25%		4.17%		2.92%		3.33%	
95% IC per Mortalità	0.26%	3.61%	2.02%	7.53%	1.18%	5.92%	1.45%	6.46%
Sintomatologia	2		13		12		14	
% Sintomatologia	0.83%		5.42%		5.00%		5.83%	
95% IC per Sintomatologi	0.10%	2.98%	2.92%	9.08%	2.61%	8.57%	3.23%	9.59%

Tab 1: Risultati/Results

L'elaborazione statistica tramite il test esatto di Fisher dei risultati delle prove a carico della banda svezzata nel mese di dicembre ha confermato che la differenza sia per quanto riguarda la mortalità (p-value ad una coda = 0,044) che per il riscontro di soggetti con sintomatologia (p-value ad una coda = 0,003) risulta statisticamente significativa.
Non è stata invece riscontrata una differenza significativa nei gruppi di svezzati del mese di gennaio né in termini di mortalità né in termini di sintomatologia nervosa.
I dati anmnestici raccolti relativi alla banda svezzata a gennaio hanno evidenziato una elevata casistica di soggetti affetti da epidermite essudativa; inoltre, la verifica retrospettiva dei risultati di esami anatomopatologici, istologici e virologici eseguiti su alcuni soggetti svezzati conferiti nel periodo considerato, ha permesso di confermare tramite istologia il dato clinico di epidermite essudativa, fattore che può aver influenzato la mortalità e la risposta immunitaria alla vaccinazione.

DISCUSSIONE

L'esperienza descritta nel presente lavoro, oltre a presentare i dati preliminari sulla possibilità di effettuare una vaccinazione precoce contro *S. suis*, mette in evidenza alcuni dei fattori da considerare nel controllo della streptococcosi.
Si sottolinea innanzitutto l'importanza di continuare a monitorare i soggetti con sintomatologia riferibile a streptococcosi sottoponendoli ad indagini anatomo-patologiche e batteriologiche, inclusa la caratterizzazione dei ceppi circolanti (Hatronjit *et al*., 2020). Infatti, un aumento della casistica potrebbe non essere conseguenza di un vero e proprio fallimento vaccinale, quanto dell'entrata in azienda o della selezione di capsulotipi non coperti dal vaccino in uso. Un corretto e costante monitoraggio permette di identificare precocemente questi ceppi e aggiornare adeguatamente il vaccino stabulogeno.
Inoltre, i dati ottenuti nel primo gruppo di studio suggeriscono che l'approccio con vaccino stabulogeno, anche precoce, può rivelarsi efficace nel contenimento della sintomatologia e mortalità data da *S. suis*.
Per quanto concerne la seconda banda coinvolta, è possibile presupporre che la concomitante presenza di ulteriori patologie abbia influenzato negativamente l'efficacia della vaccinazione, in particolare che a causa dell'epidermite si sia verificato un aumento di mortalità indipendente da *S. suis*.
Si ritiene però necessario, per una valutazione completa dell'efficacia della vaccinazione,

includere in ulteriori studi analisi sierologiche sia dei soggetti vaccinati che non vaccinati, ai fini della verifica della sieroconversione indotta dal vaccino stesso.
L'importanza di avere a disposizione vaccini stabulogeni efficaci e protocolli adatti alla specifica situazione epidemiologica dell'allevamento è inoltre legato ad una riduzione dell'utilizzo di presidi antimicrobici. In caso di incidenza elevata in un gruppo, le problematiche determinate da *S. suis* vengono tenute sotto controllo tramite terapie antibiotiche di gruppo *per os*, ma la disponibilità di un presidio preventivo efficace permetterebbe di ridurre questi interventi. Inoltre, per quanto sia generalmente riconosciuta in tutto il mondo ed un'elevata suscettibilità nei confronti dei beta-lattamici (Haenni *et al.,* 2016), stanno diventando piuttosto frequenti ceppi resistenti alla penicillina, soprattutto tra quelli appartenenti al capsulotipo 9 (Cucco *et al.*, 2022).

CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro indicano che l'applicazione di un protocollo vaccinale precoce con vaccino stabulogeno per *S. suis*, può influenzare favorevolmente l'incidenza di casi di mortalità e sintomatologia nervosa riferibili a streptococcosi, pur necessitando di ulteriori indagini da estendere ad altre realtà che presentano la stessa problematica.
Si ravvede inoltre la necessità di approfondire la valutazione dell'efficacia della vaccinazione includendo indagini sierologiche necessarie a valutare la sieroconversione.

Le attività descritte sono state svolte nell'ambito della Ricerca Corrente IZSVE 10/20 "Utilizzo della caratterizzazione genomica di *Streptococcus suis* per ottimizzare l'efficacia dei vaccini stabulogeni negli allevamenti suinicoli intensivi" finanziata dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Cucco L., Paniccià M., Massacci F. R., Morelli A., Ancora M., Mangone I., Di Pasquale A., Luppi A., Vio D., Cammà C., Magistrali C. F. New Sequence Types and Antimicrobial Drug-Resistant Strains of Streptococcus suis in Diseased Pigs, Italy, 2017-2019. Emerg Infect Dis. 2022 Jan;28(1):139-147. doi: 10.3201/eid2801.210816.
2. Haas B, Grenier D. Understanding the Virulence of Streptococcus suis: A Veterinary, Medical, and Economic Challenge. Med Mal Infect 2018 May;48 (3):159-166. doi: 10.1016/j.medmal.2017.10.001.
3. Haenni M., Lupo A., Madec J-Y. (2018) Antimicrobial resistance in Streptococcus spp. Microbiology spectrum 6 (2). doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0008-2017.
4. Hatrongjit R, Fittipaldi N, Gottschalk M, Kerdsin A. Tools for Molecular Epidemiology of Streptococcus suis. Pathogens. 2020 Jan 27;9(2). pii: E81. doi: 10.3390/pathogens9020081.
5. 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) 7572-7582Mancini F., Adamo F., Creti R., Monaco M., Alfarone G., Pantosti A., Ciervo A. A fatal case of streptococcal toxic shock syndrome caused by Streptococcus suis carrying tet (40) and tet (O/W/32/O), Italy. J Infect Chemother 22 (2016) 774e776 http://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2016.05.011
6. 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.

7. Rieckmann K., Pendzialek S. M., Vahlenkamp T., Baums C.G. A critical review speculating on the protective efficacies of autogenous Streptococcus suis bacterins as used in Europe. Porcine Health Manag. 2020; 6: 12. doi: 10.1186/s40813-020-00150-6
8. Segura M. Streptococcus suis vaccines: candidate antigens and progress. Expert Rev Vaccines. 2015;14(12):1587-608. doi: 10.1586/14760584.2015.1101349. Epub 2015 Oct 15.
9. Segura M., Fittipaldi N., Calzas C., Gottschalk M. Critical Streptococcus suis Virulence Factors: Are They All Really Critical? Trends in Microbiology, July 2017, Vol. 25, No. 7 http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2017.02.005
10. Silva L.M.G., Baums C.G., Rehm T., Wisselink H.J., Goethe R., Valentin-Weigand P. Virulence-associated gene profiling of Streptococcus suis isolated by PCR (2006). Veterinary Microbiology (115) 117-127.
11. Wisselink H., Smith H.E., Stockhfe-Zurwieden N., Peperkamp K., Vecht U. Distribution of capsular types and production of muramidase-relased protein (MRP) and extracellular factor (EF) of Streptococcus suis strains isolated from seven European countries (2000). Veterinary Microbiology 74, 237-248.

PREVALENZA DI AGENTI EZIOLOGICI IN CASI DI ABORTO IN LOMBARDIA ED EMILIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021

PREVALENCE OF ETIOLOGICAL AGENTS IN CASES OF ABORTION IN LOMBARDIA AND EMILIA ROMAGNA REGION BETWEEN 2017 AND 2021

BOSCO C., TORREGGIANI C., PROSPERI A., CHIAPPONI C., FACCINI S., ROSIGNOLI C., PUPILLO G., SALOGNI C., BASSI P., MAISANO A.M., LUPPI A.

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

Parole chiave: feti, aborto, agenti abortigeni infettivi
Keywords*:* fetuses, abortion, abortigenic infectious agents

RIASSUNTO
In questo studio sono stati analizzati retrospettivamente i risultati delle indagini di laboratorio svolte a scopo diagnostico presso le Sedi Territoriali della Lombardia e dell'Emilia Romagna dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021 su 883 casi di aborto suino. Nel 35,1% dei casi, con l'impiego di metodiche biomolecolari, è stata riscontrata la positività verso almeno uno degli agenti eziologici investigati e sono state riscontrate le seguenti prevalenze: PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (19%), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (18,5%), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (18,3%), *Chlamydia spp*. (4,8%), PPV (*Porcine parvovirus*) (2,8%), *Leptospira spp.* (2,6%). Nel 17,7% dei casi è stato individuato più di un agente eziologico abortigeno. Relativamente ai casi positivi per PCV2, in 20 casi totali la quantità di copie di genoma virale rilevata per grammo di materiale patologico testato mediante PCR quantitativa era maggiore di 10^7 e, nei casi in cui si è proceduto a conferma istopatologica, la diagnosi di aborto sostenuto da PCV2 non è stata confermata.

ABSTRACT
The results of the diagnostic investigations were retrospectively analyzed in 883 cases of swine abortion. The samples analyzed were fetuses collected during the diagnostic activity of IZSLER laboratories located in Lombardia and Emilia Romagna (Italy) between 2017 and 2021. In 35,1% of cases, the results of the different PCR tests performed were positive for at least one of the abortive etiological agents investigated that showed the following prevalences: PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (19%), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (18,5%), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (18,3%), *Chlamydia spp*. (4,8%), PPV (*Porcine parvovirus*) (2,8%), *Leptospira spp.* (2,6%). In 17,7% of the cases, more than 1 abortive etiological agent was identified. As regards PCV2 positive cases, in 20 total cases the quantity of copies of viral DNA, per gram of pathological material tested, detected by quantitative PCR was greater than 10^7. In cases where histological and immunohistochemical examinations were also performed, the diagnosis of PCV2 abortion was not confirmed.

INTRODUZIONE
Le turbe riproduttive nella scrofa rappresentano un'importante causa di perdite economiche per gli allevamenti suinicoli. Se la morte dell'embrione avviene prima del trentacinquesimo giorno di gestazione si ha il riassorbimento embrionale, successivamente inizia il periodo fetale. Quando

la causa scatenante la patologia riproduttiva insorge precocemente si possono osservare feti mummificati, altrimenti se insorge nel periodo più tardivo della gestazione si possono riscontrare suinetti nati morti, disvitali o parti prematuri. Nel caso in cui vi sia una combinazione di feti mummificati e nati morti di diverse dimensioni, la morte fetale è insorta in diversi momenti della gestazione e questo può essere conseguenza di una progressiva diffusione intrauterina di un agente infettivo (Almond *et al.*, 2006).
Gli agenti eziologici infettivi responsabili di aborto possono essere batterici tra cui *Brucella suis, Leptospira spp., Chlamydia spp.,* (Almond *et al.*, 2006) o, virali come PRRSV (*Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*), PCV2 (*Porcine circovirus 2*), EMCV (*Encephalomyocarditis virus*), ADV (*Aujeszky's disease Virus*), IAV (*Influenza Virus A*) (Saporiti *et al.*, 2021b). Negli ultimi anni, anche il PCV3 (*Porcine circovirus* 3) è stato proposto da diversi autori come potenziale agente eziologico in grado di provocare turbe riproduttive nella scrofa (Saporiti *et al.*, 2021b; Arruda *et al.*, 2019; Palinski *et al.*, 2017). Gli agenti infettivi virali sono la causa più comune di aborto nel suino e, sia in caso di infezione virale, sia in caso di infezione batterica, per poter avere maggiori possibilità di individuare l'agente infettivo causa di aborto, è importante analizzare più feti abortiti per scrofa (Kirkwood *et al.*, 2013). Inoltre, la diagnosi di alcuni di questi agenti eziologici, in particolar modo per quanto riguarda i *Circovirus* PCV2 e PCV3, assume maggiore rilevanza se la presenza del virus nei tessuti accertata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) viene confermata dalla presenza di lesioni istopatologiche tipiche e dalla positività immunoistochimica nelle cellule target. L'aborto può anche essere conseguente a cause non infettive tra cui vi sono fattori ambientali, individuali della scrofa, alimentari e tossici (Christianson, 1992; Vanderhaeghe *et al.*, 2013).
In questo studio retrospettivo sono stati analizzati i risultati delle indagini di laboratorio eseguite presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) tra il 2017 e il 2021, su feti provenienti da casi di aborto suino verificatisi in allevamenti situati nel territorio di competenza delle due regioni.

MATERIALI E METODI

Sono stati inclusi nello studio 3635 feti, provenienti da 365 aziende suinicole, conferiti presso le Sedi Territoriali dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021 corrispondenti a 883 casi di aborto. Ogni caso di aborto incluso nello studio corrisponde ad un singolo focolaio e i feti provenienti da episodi di aborto verificatisi nel tempo ma all'interno dello stesso focolaio, sono stati considerati come un unico caso. A questo proposito i casi in cui sono stati conferiti più feti in diversi momenti durante lo stesso mese o in due mesi consecutivi, sono stati considerati come un unico caso di aborto, ad eccezione di 18 casi in cui gli esiti degli esami diagnostici indicavano positività nei confronti di agenti eziologici differenti, riconducibili alla presenza di diversi focolai nella stessa azienda.
Trattandosi di uno studio retrospettivo, per ovvi motivi, per ogni caso di aborto non sono state eseguite costantemente le stesse indagini e questo è, nella routine diagnostica, determinato da diversi fattori, come ad esempio la diversa presentazione clinica dei casi sottoposti ad indagini di laboratorio. Di seguito si riporta il numero di casi in cui è stata eseguita l'indagine nei confronti di un determinato agente eziologico, sul totale dei casi inclusi nello studio: PRRSV *(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) (862/883), PCV3 (*Porcine circovirus 3*) (205/883), PCV2 (*Porcine circovirus 2*) (663/883), *Chlamydia spp.* (458/883), PPV (*Porcine parvovirus*) (634/883), *Leptospira spp.* (384/883). La prevalenza di ciascun agente infettivo investigato è stata calcolata rapportando il numero di casi positivi con quello dei casi testati.

Biologia molecolare

Gli agenti eziologici indagati mediante la metodica molecolare PCR o Real Time PCR, inclusi nello studio, sono stati: PRRSV, PCV2, PCV3, PPV, *Chlamydia spp.* e *Leptospira spp.* 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). La ricerca di PRRSV è stata eseguita mediante Real-Time RT-PCR per il gene ORF 7 (*Virotype* PRRS RT-PCR - Kit Indical). Il fegato è stato impiegato per la ricerca di PPV secondo la metodica descritta da Kim *et al.*, 2001 mentre pool di visceri sono stati impiegati per la ricerca di *Chlamydia spp.* e *Leptospira spp.* secondo quanto riportato rispettivamente da Ehricht *et al.* nel 2006 e Bedir *et al.* nel 2010.

Istologia e Immunoistochimica

Campioni di cuore, quando le condizioni di conservazione del materiale patologico lo permettevano, sono stati prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati al microtomo a 5 µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina secondo metodiche standardizzate. Un'indagine immunoistochimica per PCV2 è stata eseguita su sezioni di miocardio mediante anticorpo monoclonale *home made* (diluito 1:500), impiegando come sistema di rivelazione il Novolik Polymer (Novocastra) e come cromogeno il Novared (Vector).

RISULTATI

Tra il 2017 e il 2021 sono stati analizzati 883 casi di aborto e, dalle indagini molecolari effettuate sui feti suini, il 35,1% del totale dei casi (310/883) è risultato positivo ad almeno uno degli agenti eziologici ricercati. In figura 1 sono stati riportati i casi positivi per anno.

Come si può osservare in tabella 1 l'agente eziologico più frequentemente riscontrato rispetto alla quantità di casi testati **è** risultato essere PRRSV (19%), seguito da PCV3 (18,5%) e PCV2 (18,3%). Il numero totale di casi testati per ciascun agente eziologico ricercato è variato da un minimo di 205 casi testati per PCV3 ad un massimo di 862 casi testati per PRRSV. In tabella 1 sono riportate le prevalenze di ciascun agente eziologico investigato.

Tabella 1: Numero casi positivi in rapporto ai casi testati per agente eziologico (PRRSV, PCV3, PCV2, *Chlamydia spp., Leptospira spp.*) per anno (2017, 2018, 2019, 2020, 2021). Numero e percentuale casi positivi/casi testati per agente eziologico in totale (dal 2017 al 2021).

Table 1: Positive cases and tested cases per etiological agent (PRRSV, PCV3, PCV2, *Chlamydia spp., Leptospira spp.*) per year (2017, 2018, 2019, 2020, 2021). Number and percentage positive cases/tested cases per etiological agent in total (from 2017 to 2021).

		ANNO						
Agenti eziologici	**Casi**	**2017**	**2018**	**2019**	**2020**	**2021**	**Totale n**	**Positivi/Testati %**
PRRSV	Positivi	28	41	32	31	32	164	19,0%
	Testati	160	165	181	182	174	862	-
PCV3	Positivi	8	7	19	3	1	38	18,5%
	Testati	45	43	95	18	4	205	-
PCV2	Positivi	21	21	24	23	32	121	18,3%
	Testati	113	128	140	132	150	663	-
Chlamydia spp.	Positivi	2	4	8	4	4	22	4,8%
	Testati	80	84	99	100	95	458	-
PPV	Positivi	6	0	2	4	6	18	2,8%
	Testati	124	119	135	134	122	634	-
Leptospira spp.	Positivi	1	0	2	4	3	10	2,6%
	Testati	42	76	99	97	70	384	-

Figura 1: Casi positivi ad almeno un agente eziologico e percentuale dei casi positivi sui casi testati per anno dal 2017 al 2021.
Figure 1: Positive cases and percentage of positive cases out of the total tested cases per year from 2017 to 2021.

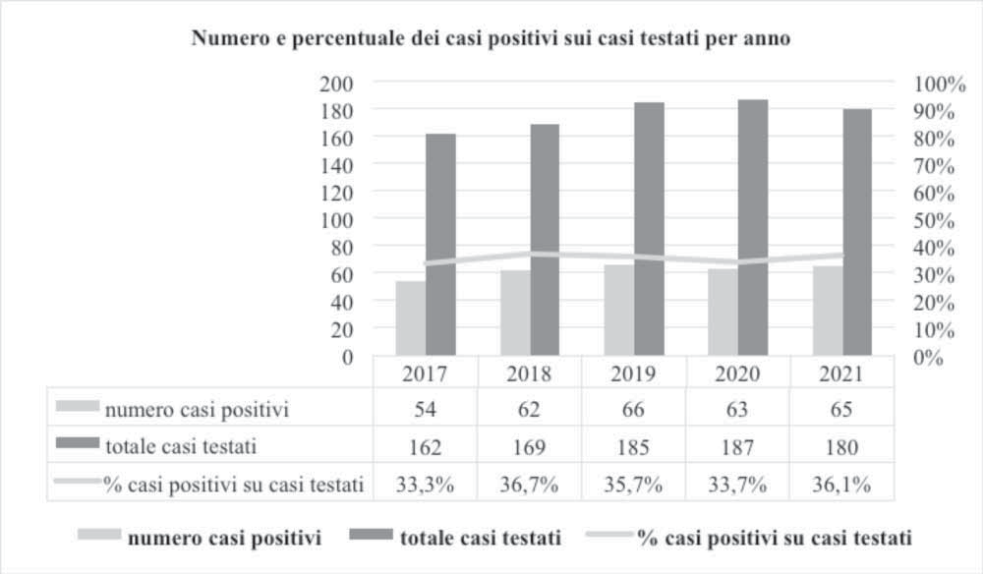


Tabella 2: Esiti di PCR quantitativa per PCV2, per ciascun caso positivo per PCV2, con quantità di copie di genoma virale/grammo $>10^7$ e $<10^7$ per anno dal 2017 al 2021 e in totale (numero e percentuale di casi positivi sul totale).
Table 2: Quantitative PCR for PCV2 of PCV2 positive cases with a quantity of viral DNA copies $>10^7$ and $<10^7$ per year from 2017 to 2021 and in total (number and percentage of positives out of the total).

PCV2: Quantità copie di genoma virale	Quantità copie di genoma virale					Totale	
	2017	2018	2019	2020	2021	n.	%
$>10^7$	3	3	5	3	6	20	16,5%
$<10^7$	18	18	19	20	26	101	83,5%

In 20 dei 121 casi positivi per la presenza di PCV2, la quantità di copie di genoma virale rilevata mediante la PCR quantitativa era maggiore di 10^7 (tab. 2).
Il 17,7% dei 310 casi positivi (55/310) erano positivi per più di un agente eziologico contemporaneamente. Di questi ultimi, 47 erano positivi per 2 agenti eziologici e in 8 casi la positività è stata rilevata verso 3 agenti eziologici. Il 70,9% dei casi (39/55) mostrava positività per PRRSV in associazione ad uno o due altri agenti eziologici, mentre PCV2 era associato ad almeno un altro agente eziologico nel 67,3% dei casi (37/55). Le diverse combinazioni di positività rilevate sono riportate in tabella 3.

Tabella 3: Casi positivi per ogni diversa combinazione dei diversi agenti eziologici investigati.
Table 3: Different combination of etiological agents and related positive cases.

Combinazione agenti eziologici	Casi positivi
PRRSV + PCV2	21
PRRSV + PCV3	6
PRRSV + *Chlamydia spp.*	5
PCV2 + PCV3	4
PCV3 + *Chlamydia spp.*	3
PRRSV + PPV	2
PCV2 + *Leptospira spp.*	2
PRRSV + PCV2 + *Chlamydia spp.*	2
PCV2 + PCV3 + PPV	2
PCV2 + *Chlamydia spp.*	1
PCV2 + PPV	1
PCV3 + PPV	1
Leptospira spp. + *Chlamydia spp.*	1
PRRSV + PCV2 + *Leptospira spp.*	1
PRRSV + PCV2 + PCV3	1
PRRSV + PCV2 + PPV	1
PCV2 + PCV3 + *Chlamydia spp.*	1

L'esame istologico è stato effettuato in 13 dei 121 casi di positività per la presenza di PCV2 e in nessun caso è stata confermata la presenza di lesioni istologiche compatibili con una diagnosi di aborto da PCV2.

DISCUSSIONE

Tra il 2017 e il 2021 il 35,1% (310/883) dei casi di aborto analizzati presso le Sedi dell'IZSLER sono risultati positivi per gli agenti infettivi abortigeni investigati. I restanti casi eziologicamente negativi potrebbero essere legati a cause infettive di aborto non indagate o, in maggior misura, a cause di aborto non infettive. Come già osservato da altri autori, una percentuale di aborti superiore al 50% può essere determinata da cause non infettive (Saporiti *et al.*, 2021b; Maldonado *et al.*, 2005). Le cause non infettive di natimortalità (distinguendo se si tratta di fenomeno che si verifica prima del parto o durante il parto), sono classificate come genetiche, ambientali, legate alla scrofa e/o ai suinetti (figura 2) (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).

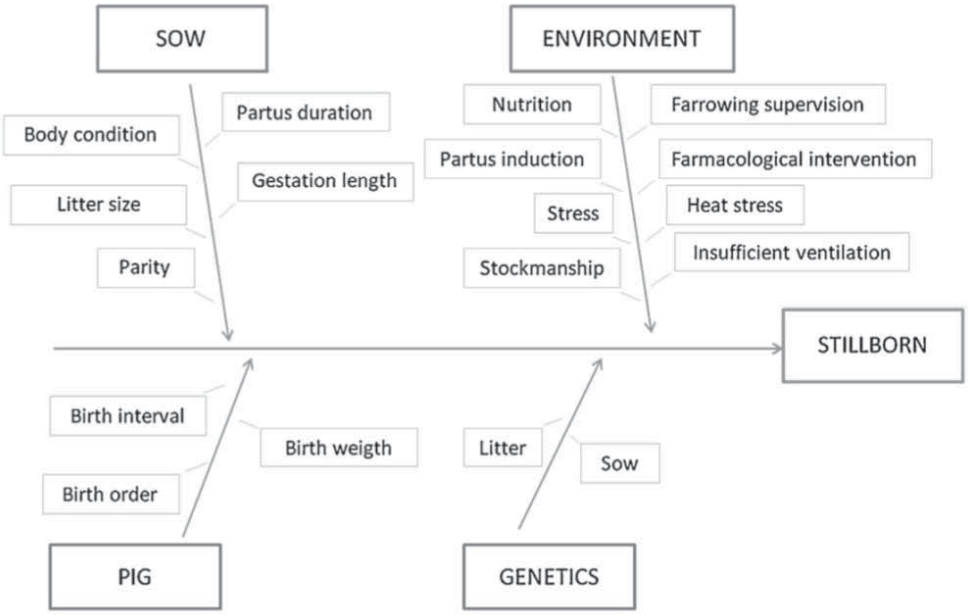


Figura 2: Fattori non infettivi legati a suinetti nati morti (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).
Figure 2: Non-infecious factors associated with stillborn piglets (Vanderhaeghe *et al.*, 2013).

In questo studio retrospettivo la prevalenza di positività riscontrate in casi di aborto, è stata valutata correlando, per ciascun agente eziologico, il numero di casi positivi al numero di casi testati. Come già accennato in precedenza, il totale di casi testati non coincide per ogni agente eziologico considerato in quanto, trattandosi di uno studio retrospettivo, non sono state effettuate le stesse indagini diagnostiche in modo standardizzato per ogni caso. Nella scelta delle indagini diagnostiche da effettuare, infatti, bisogna considerare differenze legate alla manifestazione clinica del caso oltre che al momento della gestazione in cui si è presentata l'insorgenza dell'aborto.

Il virus della PRRS è stato rilevato nel 19% dei casi, il PCV3 era presente nel 18,5% e PCV2 nel 18,3% dei casi.

I casi positivi per PRRSV (164) e per PCV2 (121) sono risultati i più frequenti tra tutti i casi positivi (310) e risultati simili sono stati osservati in 549 casi di aborto in Lombardia tra il 2011 e il 2013 in cui, a fronte di un totale di 323 casi postivi, 138 erano positivi per PCV2 e 108 erano positivi per PRRSV (Salogni *et al*., 2016). Non sorprende l'elevata prevalenza di PRRSV da casi di aborto, che da molti anni a questa parte è senza dubbio il principale responsabile di turbe riproduttive nella nostra realtà produttiva. Questo è sicuramente legato alle caratteristiche intrinseche di PRRSV in quanto, trattandosi di un virus a RNA a singolo filamento positivo, risulta essere soggetto a frequenti mutazioni e ricombinazioni. A causa della variabilità genetica e fenotipica del PRRSV l'efficacia degli interventi vaccinali spesso risulta essere sub-ottimale (Franzo *et al.*, 2021), così come la protezione immunitaria fornita dai ceppi endemici nei confronti di ceppi di PRRSV di nuova introduzione all'interno degli allevamenti.

Il *Circovirus* suino di tipo 2 (PCV2) è stato rilevato mediante qPCR in 121 casi, tuttavia questo risultato non ha trovato conferma dalle indagini istopatologiche e immunoistochimiche. La diagnosi di PCV2-RD (PCV2 *Reproductive Disease*) prevede tre criteri diagnostici: 1. aborti tardivi e nati morti, in alcuni casi con evidente ipertrofia cardiaca fetale; 2. presenza di lesioni cardiache caratterizzate da fibrosi estesa e/o miocarditi necrotizzanti; 3. presenza di elevate quantità di PCV2 nelle lesioni miocardiche e in altri tessuti fetali (Segalés, 2012).

Questi criteri sono indispensabili per la diagnosi di PCV2-RD in fase acuta, mentre per forme che si sviluppano in un arco temporale maggiore la PCR quantitativa **è considerata già di per sé significativa per la diagnosi di** PCV2-RD (Segalés *et al.*, 2012; Segalés, 2012). In particolare, valori superiori a 10^7 copie di DNA di PCV2/grammo di tessuto patologico ottenuto con PCR quantitativa, sono stati descritti come fortemente indicativi di PCV2-RD e valori maggiori di 10^5 copie di genoma virale di PCV2/grammo sono stati rilevati nei tessuti fetali di feti con miocarditi (Hansen *et al.*, 2010; Segalés, 2012). Nel presente studio, nei casi in cui è stato effettuato l'esame istologico non è stata osservata la presenza di miocarditi, e in soli 20 casi **è stata rilevata una quantità maggiore di 10^7** copie di genoma virale di PCV2/grammo di materiale patologico. In 6 di questi ultimi casi l'esame istologico è stato effettuato ed è risultato negativo per la presenza di lesioni miocardiche caratteristiche ed in 5 casi **è** risultata negativa anche l'indagine immunoistochimica.

Il PCV3 è stato descritto per la prima volta nel 2015 in USA in suini con lesioni cardiache e infiammazione multisistemica (Phan *et al.*, 2016), in scrofe con lesioni ascrivibili a PDNS (*Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome*) e in feti (Palinski *et al.*, 2017) e il suo ruolo come agente patogeno in genere e abortigeno in particolare è stato molto dibattuto. Il solo rilevamento del virus nei tessuti in assenza di evidenza di lesioni non è sufficiente per poter formulare una diagnosi in quanto si tratta di un virus endemico (Arruda *et al.*, 2019). Sono infatti stati proposti tre criteri diagnostici per la definizione di caso di PCV-3-RD (PCV3 *Reproductive Disease*): 1. problemi riproduttivi tardivi ed elevata mortalità perinatale; 2. infiammazione perivascolare in diversi tessuti da linfoplasmocitica a linfoistiocitica; 3. presenza di quantità da moderata a elevata di PCV3 nei tessuti con lesioni (Saporiti *et al.*, 2021a). In alcuni studi condotti in USA e in Europa la presenza di PCV3 in tessuti fetali è stata associata a lesioni istologiche tra cui miocarditi, arteriti e periarteriti ed è stata confermata da ibridazione in situ (Arruda *et al.*, 2019; Saporiti *et al.*, 2021b). In Italia, PCV3 è stato descritto nel 2017 in due pool di tessuti prelevati da suinetti nati morti e da feti, provenienti da due aziende lombarde in cui si verificavano turbe riproduttive. In entrambi i casi la quantità di copie di genoma virale di PCV3 per grammo di tessuto analizzato è risultata essere elevata e maggiore di 10^{10}, i campioni non erano positivi verso altri agenti eziologici testati mediante PCR e gli esami istologici effettuati non dimostrarono lesioni significative (Faccini *et al.*, 2017). Nel nostro studio 38 casi sono risultati positivi in PCR per la presenza di PCV3 e in 20 di questi (52,6%) PCV3 è stato l'unico agente eziologico rilevato, tuttavia il dato istopatologico non ha confermato questo risultato. Inoltre, nonostante il PCV3 sia risultato tra gli agenti eziologici maggiormente prevalenti, il numero totale di casi testati per PCV3, durante gli anni considerati, è stato inferiore rispetto a quello dei casi testati per gli altri agenti eziologici.

Le specie di *Chlamydia* che possono infettare il suino sono *Chlamydia suis, Chlamydia abortus, Chlamydia pecorum e Chlamydia psittaci* (Schautteet *et al.*, 2011). Nei 458 casi di aborto analizzati per *Chlamydia spp.*, i positivi sono stati il 4,8% del totale e, limitatamente alla specie *Chlamydia suis*, da uno studio condotto in aziende suinicole del Nord Italia tra il 2018 e il 2020, il 12% del totale dei campioni analizzati è risultato positivo per *Chlamydia suis* e il 18% di questi erano feti (De Lorenzi *et al.*, 2021). La prevalenza di casi di aborto positivi per

PPV e per *Leptospira spp.* **è risultata inferiore del** 3%. I casi positivi per PPV (18) erano tra i meno frequenti tra tutti i casi positivi (310) e in Nord Italia tra il 2011 e il 2013 erano stati osservati risultati simili (non considerando le frequenze inferiori di positività registrate nei confronti di agenti eziologici non indagati in questo studio) (Salogni *et al*., 2016).

CONCLUSIONI

Dai risultati emersi da questo studio retrospettivo si conferma che le turbe riproduttive della scrofa sono solo in pochi casi (meno del 50%) conseguenti ad infezioni sostenute da agenti eziologici abortigeni ed è quindi importante porre attenzione a tutti i fattori di rischio anche non infettivi che possono provocare aborto. Inoltre, limitatamente agli agenti abortigeni infettivi si può constatare quanto sia importante l'impiego dell'istologia e dell'immunoistochimica, in modo da poter effettuare diagnosi di malattia e non solo la determinazione della presenza di un agente potenzialmente patogeno. Questo è particolarmente importante nei casi di positività, ottenuta con indagini biomolecolari, per PCV2 e PCV3.

Infine, i dati riportati in questo studio risultano utili per poter avere un'immagine della prevalenza degli agenti abortigeni circolanti in regioni ad elevata densità di allevamenti suinicoli quali la Lombardia e l'Emilia Romagna negli ultimi 5 anni e potrebbe essere utile per studi futuri per poter avere indicazioni sull'andamento di tali prevalenze.

RINGRAZIAMENTI

Parte dei dati analizzati in questo studio derivano dal PRC2017007 finanziato dal Ministero della Salute.

BIBLIOGRAFIA

1. Almond G.W., Flowers W.L., Batista L., D'Allaire S. (2006) "Diseases of the Reproductive System " in Straw B. E., Zimmerman J.J., D'Allaire S., Tailor D. J. "Disease of Swine", 9a ed. UK, Wiley-Blackwell, 723-749.
2. Arruda B., Piñeyro P., Derscheid R., Hause B., Byers E., Dion K., Long D., Sievers C., Tangen J., Williams T., & Schwartz K. (2019) "PCV3-associated disease in the United States swine herd". *Emerging microbes & infections*, *8*(1), 684–698. https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1613176
3. Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A.M., Turhan V., Basustaoglu A.C. (2010), "Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Leptospira spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay", Pol J Microbiol 59: 167-73. Christianson WT. (1998) "Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death." Vet Clin North Am Food Anim Pract., 8(3):623-39. doi: 10.1016/s0749-0720(15)30708-8. PMID: 1446274.
4. Christianson W. T. (1992) "Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death." *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, *8*(3), 623–639. https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30708-8.
5. De Lorenzi G., Rigamonti S., Lodola C.M., , Bazzucchi M., Lauriano A., Prati P., Vicari N. (2021) "Prevalence of Chlamydia suis in swine samples analysed from 2018 to 2020: an emerging pathogen?". ESPHM 2020+1: 12th European Symposium on Porcine Health Management: proceedings, 14th-16th April, 2021. p 302
6. Ehricht R., Slickers P., Goellner S., Hotzel H., Sachse K. (2006) "Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies." Mol Cell Probes. 2006 Feb;20(1):60-3. doi: 10.1016/j.mcp.2005.09.003. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16330186.
7. Faccini S., Barbieri I., Gilioli A., Sala G., Gibelli L.R., Moreno A., Sacchi C., Rosignoli C., Franzini G., Nigrelli A. (2017) "Detection and genetic characterization of Porcine

circovirus type 3 in Italy." Transbound Emerg Dis. 64(6):1661-1664. doi: 10.1111/tbed.12714. Epub 2017 Sep 17. PMID: 28921870.

8. Franzo G., Barbierato G., Pesente P., Legnardi M., Tucciarone C. M., Sandri G., Drigo, M. (2021). "Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Epidemiology in an Integrated Pig Company of Northern Italy: A Multilevel Threat Requiring Multilevel Interventions". *Viruses*, *13*(12), 2510. https://doi.org/10.3390/v13122510
9. Kim J., Choi C., Han D.U., Chae C. (2001) "Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by multiplex PCR". Vet Rec. 149: 304-305.
10. Kirkwood R. N., Althouse G.C., Yaeger, M.J., Carr J., and Almond G.W. (2012) "Diseases of the Reproductive System " in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Disease of Swine", 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 329-347.
11. Hansen M.S., Hjulsager C.K., Bille-Hansen V., Haugegaard S., Dupont K., Høgedal P., Kunstmann L., Larsen L.E. (2010) "Selection of method is crucial for the diagnosis of porcine circovirus type 2 associated reproductive failures". Vet Microbiol. Jul 29;144(1-2):203-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.12.038. Epub 2010 Jan 11. PMID: 20097019.
12. Maldonado J., Segalés J., Martínez-Puig D., Calsamiglia M., Riera P., Domingo M., Artigas C. (2005). "Identification of viral pathogens in aborted fetuses and stillborn piglets from cases of swine reproductive failure in Spain". *Veterinary journal (London, England : 1997)*, *169*(3), 454–456. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2004.05.007
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., Piñeyro P., Shang P., Yuan F., Guo R., Fang Y., Byers E., Hause B. M. (2017) "A Novel Porcine Circovirus Distantly Related to Known Circoviruses Is Associated with Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome and Reproductive Failure". *Journal of virology*, *91*(1), e01879-16. https://doi.org/10.1128/JVI.01879-16
15. Phan T.G., Giannitti F., Rossow S., Marthaler D., Knutson T.P., Li L., Deng X., Resende T., Vannucci F., Delwart E. (2016) "Detection of a novel circovirus PCV3 in pigs with cardiac and multi-systemic inflammation." Virol J. 11;13(1):184. doi: 10.1186/s12985-016-0642-z. Erratum in: Virol J. 2017 Apr 28;14 (1):87. PMID: 27835942; PMCID: PMC5105309.
16. Salogni C., Lazzaro M., Giacomini E., Giovannini S., Zanoni M., Giuliani M., Ruggeri J., Pozzi P. Pasquali, P. Boniotti M. B., Alborali, G. L. (2016). "Infectious agents identified in aborted swine fetuses in a high-density breeding area: a three-year study". *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, *28*(5), 550–554. https://doi.org/10.1177/1040638716656024
17. Saporiti V., Franzo G., Sibila M., Segalés J. "Porcine circovirus 3 (PCV-3) as a causal agent of disease in swine and a proposal of PCV-3 associated disease case definition." (2021a) Transbound Emerg Dis. 68(6):2936-2948. doi: 10.1111/tbed.14204. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34184834.
18. Saporiti V., Valls L., Maldonado J., Perez M., Correa-Fiz F., Segalés J., Sibila, M. (2021b) "Porcine Circovirus 3 Detection in Aborted Fetuses and Stillborn Piglets from Swine Reproductive Failure Cases". *Viruses*, *13*(2), 264. https://doi.org/10.3390/v13020264
19. Schautteet K., Vanrompay D. (2011) "Chlamydiaceae infections in pig." Vet Res. Feb 7;42(1):29. doi: 10.1186/1297-9716-42-29. PMID: 21314912; PMCID: PMC3041669.

20. Segalés J. (2012) “Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis”. Virus Res.; 164(1-2):10-9. doi: 10.1016/j.virusres.2011.10.007. Epub 2011 Oct 17. PMID: 22056845.
21. Segalés J., Allan G. M., Domingo M. (2012) “Porcine Circoviruses ” in Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. “Disease of Swine”, 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 405-417.
22. Vanderhaeghe C., Dewulf J., de Kruif A., Maes D. (2013) “Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: a review”. Animal reproduction science, 139(1-4), 76–88. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.007

STUDIO PRELIMINARE PER LA CREAZIONE DI UNA FILIERA DI SUINI ANTIBIOTIC-FREE: MONITORAGGIO DEGLI AGENTI BATTERICI E VALUTAZIONE DELL'ANTIBIOTICORESISTENZA

PRELIMINARY STUDY FOR THE CREATION OF AN ANTIBIOTIC-FREE PIG SUPPLY CHAIN: MONITORING OF BACTERIAL AGENTS AND ASSESSMENT OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE

VALENTINI F.[1], CAPPUCCIO P.[2], CALISESI L.[2], LUPPI A.[3], TOSI G.[4], CHIUSI A.[4], RUSCELLI R.[4], BERTASI B.[5], MATTEI S.[4], FIORENTINI L.[4]

[1] *Veterinario libero professionista;*
[2] *Medico Veterinario, GESCO S.C.A.;*
[3] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Parma;*
[4] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Forlì;*
[5] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Brescia.*

Parole chiave: antibiotic-free, post-svezzamento, patologie batteriche
Keywords*: antibiotic-free, post-weaning, bacterial diseases*

RIASSUNTO

La resistenza agli antimicrobici determina gravi rischi per la salute pubblica ed è caratterizzata da un impatto economico rilevante. Nella filiera suina, uno dei punti critici per l'insorgenza di resistenze negli animali e nei loro prodotti, è di fondamentale importanza promuovere l'uso razionale e consapevole del farmaco. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di monitorare la circolazione ed i livelli di antibiotico resistenza di alcuni agenti batterici patogeni e commensali (*Streptococcus suis, Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) isolati in un ciclo produttivo di suini (post-svezzamento), come studio preliminare per la creazione di una filiera *antibiotic free*. Nell'arco di 5 mesi, 89 carcasse sono state sottoposte ad esame necroscopico e raccolta di un panel di campioni con approccio sistematico. Su tutte le matrici è stato applicato un protocollo batteriologico standardizzato che ha portato all'isolamento di 40 ceppi di *S. suis*, 46 di *E. coli* e 28 di *S. aureus*. Tali ceppi sono stati caratterizzati con metodiche sierologiche e di biologia molecolare. I ceppi di *S. suis* e di *E. coli* sono stati inoltre testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici. I risultati dello studio confermano l'ampia diffusione dell'antimicrobico resistenza negli allevamenti suinicoli e mettono in evidenza alcune criticità riscontrate nel percorso di creazione di filiere *antibiotic free*, sottolineando la necessità un approccio olistico, in una logica di "One Health".

ABSTRACT

Antimicrobial resistance (AMR) poses serious risks to public health and has a significant economic impact. In the pig supply chain, one of the critical points for the emergence of AMR in animals and their products, it is of fundamental importance to promote the rational and responsible use of drugs. The aim of this work was to monitor the circulation and antibiotic resistance levels of some pathogenic and commensal bacteria (*Streptococcus suis, Escherichia coli and Staphylococcus aureus*) isolated in a pig production cycle (post-weaning), as a preliminary study for the creation

of an antibiotic free supply chain. Over a period of 5 months, the necroscopic examination of 89 carcasses was carried out and a panel of samples was collected from each carcass using a systematic approach. A standardised bacteriological protocol was applied to all samples, resulting in the isolation of 40 strains of *S. suis*, 46 of *E. coli* and 28 of *S. aureus*. These strains were characterised using serological and molecular methods. *S. suis* and *E. coli* strains were also tested for antimicrobial susceptibility. The results of the study confirm the wide spread of antimicrobial resistance in the pig farming system and highlight some weak points encountered in the creation of antibiotic free supply chains, thus emphasising the need for a holistic approach, in a "One Health" perspective.

INTRODUZIONE

Alcune previsioni su scala mondiale indicano che nel 2050 l'antimicrobico-resistenza (AMR) diventerà la principale causa di morte nell'uomo, con 10 milioni di decessi l'anno, ridurrà il PIL di 2-3,5 punti e determinerà un costo complessivo di 100 trilioni di dollari (Jim O'Neill, 2014)\ncalling for ideas to bring this growing threat under control. This is the Review\nteam's first paper, where we demonstrate that there could be profound health\nand macroeconomic consequences for the world, especially in emerging economies,\nif antimicrobial resistance (AMR. In Europa, negli ultimi anni, ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EFSA (European Food Safety Authority) ed EMA (European Medicines Agency) hanno: (i) messo in relazione il consumo di antibiotici con la frequenza di insorgenza di AMR nell'uomo e negli animali (ECDC, EFSA, EMA, 2015); (ii) fornito una serie di misure da mettere in atto per ridurre l'uso di antimicrobici negli animali e valutato il loro impatto sulle produzioni (EMA, EFSA, 2017); (iii) stabilito indicatori armonizzati, per la medicina umana e veterinaria, per il monitoraggio del consumo di antibiotici e la sorveglianza dell'AMR (ECDC, EFSA, EMA, 2017). In considerazione della gravità e dell'importanza di tale fenomeno, si sta cercando di intervenire a livello nazionale ed internazionale redigendo Action Plan e linee guida che promuovano la riduzione del consumo di antibiotici e un uso razionale e consapevole del farmaco, sia in campo umano che veterinario, in una logica di "One Health", con un approccio olistico "from farm to fork".

L'Italia è il secondo maggiore consumatore europeo di antibiotici ad uso veterinario (EMA, 2020). Il Ministero della Salute Italiano dal 2014 produce annualmente il "Piano di monitoraggio armonizzato sulla resistenza agli antimicrobici di batteri zoonotici e commensali" (Ministero della Salute e CRAN-AR, 2022) e ha avviato nel 2017 il Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) (Ministero della Salute, 2017). Quest'ultimo, rivolgendosi sia alla medicina umana che veterinaria si propone di ridurre la frequenza di infezioni causate da microrganismi AMR e la frequenza di infezioni associate ad ospedalizzazione e assistenza sanitaria. A questo scopo, gli obiettivi prefissati per il settore veterinario nel 2020 erano: (i) la riduzione almeno del 30% del consumo complessivo di antibiotico; (ii) la diminuzione di consumo di *Highest Priority Critically Important Antibiotics* (HPCIA) del 10% (WHO, 2018); (iii) : la riduzione del consumo della colistina a livelli inferiori ai 5 mg/PCU (*Population Correction Unit*); (iv) la riduzione della somministrazione di antibiotici per via orale almeno del 30%.

Per far fronte a tali sfide sanitarie è necessario un approccio congiunto finalizzato ad un miglioramento delle condizioni di benessere e della biosicurezza degli allevamenti, nell'ottica più generale di un'implementazione degli aspetti preventivi delle malattie infettive, nonché ad un miglioramento delle capacità diagnostiche sia in campo che in laboratorio. Al di fuori di questo contesto e soprattutto per andare incontro alle richieste dei consumatori, oggi si sta assistendo anche allo sviluppo di filiere zootecniche *antibiotic free*.

La filiera suina, essendo uno dei punti critici per l'insorgenza di resistenze (sia in batteri zoonosici

che in patogeni opportunisti per l'uomo) negli animali e nei loro prodotti, deve affrontare il problema sensibilizzando tutti gli attori coinvolti, attivando piani di monitoraggio sul consumo di farmaco e sullo sviluppo di resistenze, incentivando studi finalizzati ad indagare le possibili soluzioni alle principali criticità riscontrate nel perseguimento di tale obiettivo (Diegoli et al., 2018).
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di monitorare la circolazione ed i livelli di antibiotico resistenza di alcuni agenti batterici patogeni e commensali (*Streptococcus suis, Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) isolati in un ciclo produttivo di suini (post-svezzamento), come studio preliminare per la creazione di una filiera *antibiotic free*.

MATERIALI E METODI

Animali e allevamenti

L'area di studio del progetto è stata una "micro-filiera", all'interno della produzione suinicola di una azienda agroalimentare italiana, costituita dai cosiddetti controsessi (maschi esclusi dai circuiti DOP) e da femmine non selezionate per divenire riproduttori. Tali animali provengono da un allevamento di scrofe gran parentali (sito 1), organizzato in bande trisettimanali, con una produzione per banda destinata alla micro-filiera sopra descritta di circa 400 animali. Ad una età di 28 giorni (6-7 kg peso vivo) i lattoni vengono trasferiti nel sito 2, per essere successivamente accasati 65 giorni dopo (25-28 kg peso vivo) in un allevamento da ingrasso (sito 3), dove concludono il ciclo produttivo al raggiungimento del peso di macellazione.

Prelievo dei campioni

Il progetto è stato realizzato nell'arco di 5 mesi, da febbraio a luglio 2021. Nel rispetto degli obiettivi prefissati, l'attività di monitoraggio si è concentrata sull'allevamento ritenuto punto critico della micro-filiera in esame (sito 2), che è stato visitato con frequenza almeno settimanale. Gli altri due siti produttivi sono stati visitati due volte ciascuno.
Nel corso dello studio, ogni suinetto deceduto proveniente dal sito 2 è stato sottoposto ad un protocollo diagnostico standardizzato. In via preliminare, sono stati raccolti i dati relativi al segnalamento e all'anamnesi e sono stati osservati ed interpretati eventuali quadri clinici nel gruppo di appartenenza. Successivamente, entro 24 ore dalla morte, ogni carcassa in adeguato stato di conservazione è stata trasportata, nel rispetto delle buone norme su raccolta, conservazione e trasporto dei campioni biologici, al laboratorio di riferimento individuato (sede di Forlì dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna - IZSLER).

Esami necroscopici

Per ogni carcassa conferita è stato svolto un esame necroscopico con approccio sistematico ed è stato raccolto un panel di campioni standardizzato (amigdale, valvole cardiache, liquido cefalo-rachidiano, milza, polmoni (bronchi e pleura), linfonodi mesenterici, piccolo intestino, reni), a cui poteva essere associato il prelievo di altre matrici qualora fossero emersi quadri patologici ritenuti rilevanti.

Diagnostica batteriologica

Tutte le matrici raccolte sono state seminate sui terreni colturali Agar sangue (AG), Hektoean enteric agar (HE), Kanamycin Aesculin Azide agar (KAA) seguendo un protocollo standardizzato (Tabella 1). È stata inoltre svolta una ricerca sistematica di sostanze inibenti nei reni, tramite semina su terreno agarizzato Standard II, addizionato con spore di *Bacillus subtilis*. Le piastre sono state successivamente incubate in termostato a 37±1°C in condizioni di aerobiosi per 18-

24h. Eventuali matrici patologiche aggiuntive sono state processate secondo metodiche interne standardizzate.

Tabella 1. Protocollo microbiologico standardizzato in uso nel presente progetto.

***Table 1**. Standardised microbiological protocol used in the present study.*

Matrice	Terreni colturali
Amigdale	AG, HE, KAA
Valvole cardiache	
Liquido cefalo-rachidiano	
Milza	
Bronchi	
Pleura	
Linfonodi mesenterici	AG, HE
Piccolo intestino	
Reni	Sostanze inibenti

Terminato il periodo di incubazione, è stata effettuata la lettura delle piastre e le colonie appartenenti ad agenti patogeni o commensali sono state trapiantate per poter eseguire successivi approfondimenti diagnostici. In particolare, considerando la loro primaria importanza come agenti patogeni in sito 2, è stato scelto di focalizzare l'attività nei confronti dei ceppi di *Streptococcus suis* e di *Escherichia coli*. Inoltre, è stata posta particolare attenzione verso i ceppi di *Staphylococcus aureus*, in quanto possibili portatori di geni codificanti per la resistenza alla meticillina, e quindi rilevanti per la salute umana.

Le colonie con morfologia riconducibile a *Streptococcus* spp. sono state sottoposte a colorazione di Gram, test dell'ossidasi e della catalasi. La conferma è avvenuta tramite la metodica di identificazione biochimica miniaturizzata Api® 20 Strep (bioMérieux). Le colonie che presentavano profilo corrispondente sono state in seguito inviate alla sede di Parma dell'IZSLER per l'esecuzione di metodiche di biologia molecolare (PCR Multiplex amplificante le aree genomiche che codificano per i geni *gdh*, *cps1*, *cps2*, *cps1/2*, *cps7* e *cps9*) per l'identificazione e caratterizzazione dei principali sierotipi di *S. suis* di interesse diagnostico: 1, 2, 7, 9. I ceppi di *S.suis* per cui non è stato possibile determinare il capsulotipo con tale metodica, sono stati sottoposti a caratterizzazione sierologica, tramite test di agglutinazione su vetrino, per l'identificazione dei sierotipi 4 e 5.

Le colonie con morfologia e colorazione di Gram riconducibile a *E. coli*, dopo la valutazione di eventuale alone emolitico su agar sangue, sono state sottoposte a prove biochimiche-enzimatiche mediante galleria miniaturizzata Microgen GN-ID (Novacyt Group). Le colonie che presentavano un profilo corrispondente sono state inviate alla sede di Brescia dell'IZSLER per l'esecuzione di analisi sierologiche e di biologia molecolare. La caratterizzazione sierologica, a livello di sierogruppo, è stata svolta mediante la tecnica di agglutinazione lenta a caldo, con l'impiego di 30 diversi antisieri O gruppo-specifici. La ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità è stata effettuata attraverso metodica PCR multiplex per i geni codificanti le fimbrie *F4, F5, F6, F18, F41*, le tossine termostabili *STa* e *STb*, la tossina termolabile *LT* e la tossina "shiga-like" *Stx2e*. I ceppi di *E. coli* sono stati classificati come enterotossigeni (ETEC) o come produttori di shiga-

tossine (STEC) in accordo con quanto riportato da Luppi et al. (2016bdue to Escherichia coli, is an important cause of economic losses to the pig industry primarily as a result of mortality and worsened productive performance. In spite of its relevance, recent data about the prevalence of virulence genes and pathotypes among E. coli isolates recovered from cases of PWD in Europe are scarce.\nRESULTS: This study investigates the prevalence of fimbrial and toxin genes of E. coli by PCR among 280 farms with PWD across Europe. A total of 873 samples collected within the first 48 h after the onset of PWD (occurring 7-21 days post weaning).
Le colonie con morfologia riconducibile a *Staphylococcus* spp. sono state sottoposte preliminarmente a colorazione di Gram, test dell'ossidasi e della catalasi, e successivamente alla metodica di identificazione biochimica miniaturizzata Api® Staph (bioMérieux) per la conferma. Le colonie che presentavano un profilo corrispondente a *S. aureus* sono state in seguito inviate alla sede di Brescia dell'IZSLER per l'esecuzione delle seguenti analisi di biologia molecolare: (i) identificazione di ceppi meticillino-resistenti (MRSA) mediante PCR multiplex, tramite verifica della presenza dei geni *mecA* e *mecC* e conferma della specie; (ii) ricerca di geni codificanti enterotossine (*sea, seb, sec, sed, see, ser, seg, seh, sei, sej, sep*) con PCR Multiplex; (iii) genotipizzazione mediante Spa typing; (iv) genotipizzazione mediante Multilocus Sequence Typing (MLST).

Determinazione dei profili di antibiotico-resistenza
Gli isolati di *S. suis* e *E. coli* sono stati testati per la determinazione della sensibilità agli antimicrobici mediante il metodo Kirby-Bauer (metodo della diffusione su piastra) (CLSI_VET, 2018a, 2018b, 2019), utilizzando due differenti pannelli di molecole antimicrobiche. Il primo, per *S. suis*, conteneva: acido nalidixico (NA), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), cefalotina (KF), ceftiofur (EFT), enrofloxacin (ENR), eritromicina (E), florfenicolo (FFC), kanamicina (K), oxacillina (OX), penicillina (P), pirlimicina (PIR), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT). Il secondo, per *E. coli*, era composto da: acido nalidixico (NA), aminosidina (AM), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), apramicina (APR), cefazolina (CZ), enrofloxacin (ENR), florfenicolo (FFC), gentamicina (CN), kanamicina (K), tetraciclina (TE), tilmicosina (TIL), trimetoprim + sulfonamidi (SXT). La lettura è stata effettuata mediante misurazione manuale degli aloni di inibizione e l'interpretazione è stata realizzata secondo standard internazionalmente riconosciuti (CLSI_VET, 2018a, 2018b, 2019), esprimendo un risultato qualitativo (S-sensibile, I-intermedio, R-resistente) per ogni molecola antibiotica testata. In accordo con Luppi et al. (2016), nell'elaborazione dei risultati i ceppi intermedi (I) sono stati considerati come resistenti (R). Le molecole testate sono state raggruppate in accordo con Magiorakos et al. (2012)extensively drug-resistant (XDR e i ceppi sono stati classificati come: "multi-resistenti" (MDR), se resistenti a più di 3 diverse classi di antibiotici; "con resistenza estesa" (XDR), se resistenti a tutti gli antibiotici ad eccezione di 1 o 2 classi; "pan-resistenti" (PDR), se resistenti a tutte le molecole testate.

RISULTATI
Nel corso dello studio l'allevamento delle scrofe gran parentali (sito 1) e l'ingrasso (sito 3) sono stati visitati due volte ciascuno. Il sito 2, su cui si è focalizzata l'attività di monitoraggio, è stato visitato 55 volte nell'arco dei 5 mesi di attività. Sono state sottoposte a necroscopia 89 carcasse: 87 animali provenienti dal sito 2 e 2 suinetti del sito 1 morti dopo aver manifestato sintomatologia neurologica, durante le procedure di carico per il trasporto verso il sito 2.
A seguito della diagnostica batteriologica standardizzata sulle matrici raccolte, sono stati isolati 40 ceppi di *S. suis*, 46 ceppi di *E. coli* e 28 ceppi di *S. aureus*.

Diagnostica batteriologica e determinazione dei profili di antibiotico-resistenza
Streptococcus suis

I 40 ceppi di *S. suis* sono stati prevalentemente isolati da valvole cardiache (n=10), polmone (bronchi e pleura) (n=10), liquido cefalo-rachidiano (n=8), amigdale (n=8) e in misura minore dalla milza (n=4). Alla caratterizzazione sierologica, 17 ceppi sono risultati non tipizzabili mentre la restante quota si è quasi equamente distribuita tra i sierotipi rilevabili con le metodiche utilizzate, ad eccezione del sierotipo 2 che è stato isolato una sola volta (Tabella 2).

Tabella 2. Sierotipi di *S. suis* rilevati, in ordine di frequenza.
***Table 2**. Frequency of S. suis serotypes detected.*

Sierotipo	n. ceppi	Percentuale
non tipizzabile (NT)	17	42,5%
7	5	12,5%
9	5	12,5%
1	4	10,0%
4	4	10,0%
5	4	10,0%
2	1	2,5%
totale	**40**	

Dagli antibiogrammi è emersa una diffusa sensibilità alle penicilline (AMC, AMP, P), alle cefalosporine di I (KF) e III (EFT) generazione e agli amfenicoli (FFC) (Figura 1). Nonostante ciò, 33 ceppi (82,5%) sono risultati essere MDR, 2 XDR ed 1 PDR.

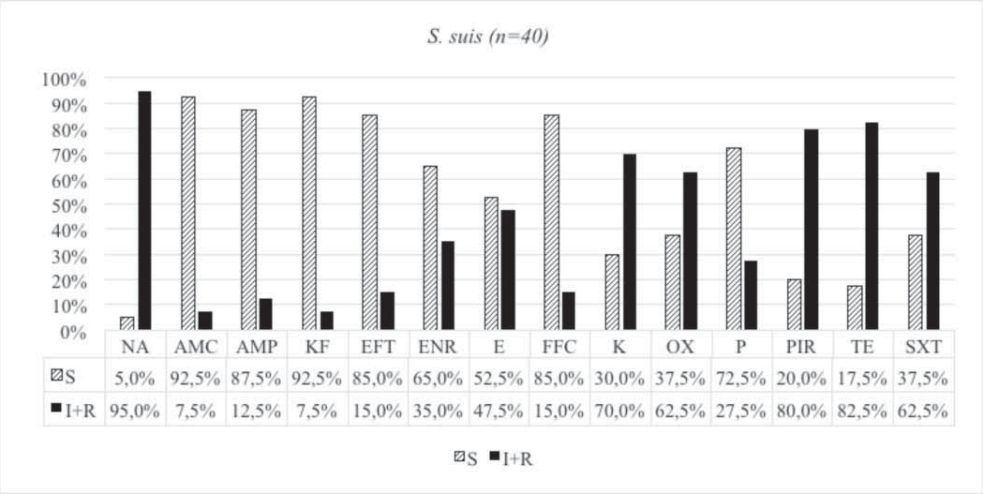


Figura 1. Esiti degli antibiogrammi di *S. suis* nei confronti di: acido nalidixico (NA), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), cefalotina (KF), ceftiofur (EFT), enrofloxacin (ENR), eritromicina (E), florfenicolo (FFC), kanamicina (K), oxacillina (OX), penicillina (P), pirlimicina (PIR), tetraciclina (TE), trimetoprim + sulfonamidi (SXT).

***Figure 1**. Outcomes of S. suis antibiograms towards the 14 molecules listed above.*

Escherichia coli
I 46 ceppi di *E. coli* sono stati prevalentemente isolati dall'intestino tenue (n=28), ma sono stati rinvenuti anche nei linfonodi mesenterici (n=6), liquido cefalo-rachidiano (n=4), milza (n=3), colon (n=2), valvole cardiache (n=2) e bronchi (n=1). Alla valutazione delle colonie su Agar sangue, 24 ceppi presentavano emolisi. Dalle indagini sierologiche si è osservato come il sierogruppo O20 sia stato il più rappresentato (n=18) (Tabella 3), mentre dalle analisi biomolecolari è emerso che di 6 ceppi, tutti emolitici, 5 erano classificabili come ETEC ed 1 come STEC (Tabella 4).

Tabella 3. Risultati delle analisi sierologiche sui ceppi di *E. coli*, in ordine di frequenza.
Table 3*. Frequency of E. coli serogroups isolated in the present study.*

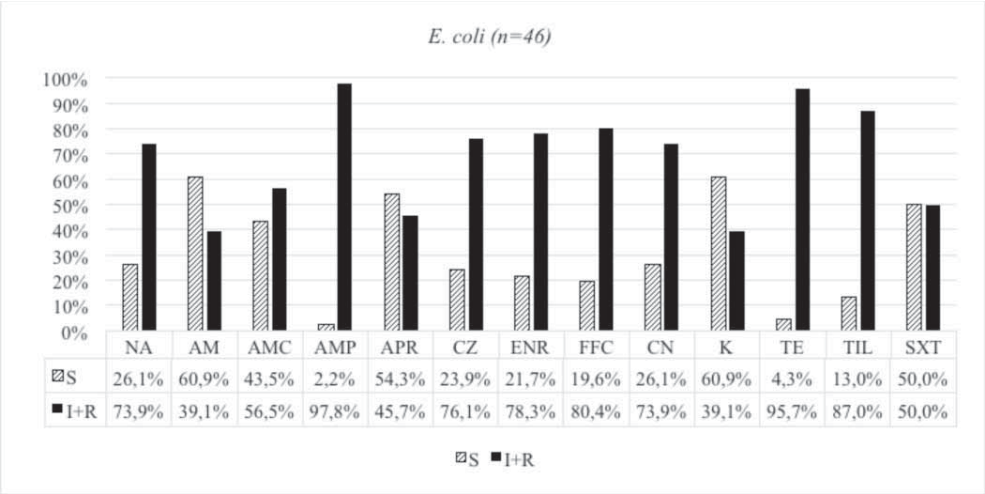
sierogruppo	n. ceppi	percentuale
O20	18	39,1%
O8	6	13,0%
NT	6	13,0%
O141	5	10,9%
O15	4	8,7%
O86	2	4,3%
O157	2	4,3%
O2	1	2,2%
O128	1	2,2%
O153	1	2,2%
totale	**46**	

Tabella 4. Genotipizzazione dei ceppi di *E. coli*. Ogni lettera (a-f) rappresenta una diversa combinazione di fattori di patogenicità, mentre il numero a cui le lettere sono associate corrisponde alla frequenza con cui la combinazione si è presentata.
Table 4*. E. coli strains genotyping. Each letter (a-f) represents a different combination of virulence factors, while the number with which the letters are associated corresponds to the frequency with which the combination occurred.*

		Fattori di patogenicità						
		F18	**LT**	**STA**	**STB**	**STX2E**	**nessuno**	**tot ceppi**
n. fattori compresenti	**0**	-	-	-	-	-	33	33
	1	-	-	-	3^{a}	-	-	3
	2	2^{b}, 1^{e}	3^{d}	2^{b}, 1^{c}	1^{c}, 3^{d}	1^{e}	-	7
	3	3^{f}	-	3^{f}	3^{f}	-	-	3
	freq. fattori	**6**	**3**	**6**	**10**	**1**		**46**

Dagli antibiogrammi è emerso che la percentuale di ceppi di *E.coli* sensibili alle 13 molecole non ha mai superato quota 61% (Figura 2), e che la totalità dei ceppi è risultata essere o MDR (n=26) o XDR (n=20).

Figura 2. Esiti degli antibiogrammi di *E. coli* nei confronti di: acido nalidixico (NA), aminosidina (AM), amoxicillina + acido clavulanico (AMC), ampicillina (AMP), apramicina (APR), cefazolina (CZ), enrofloxacin (ENR), florfenicolo (FFC), gentamicina (CN), kanamicina (K), tetraciclina (TE), tilmicosina (TIL), trimetoprim + sulfonamidi (SXT).
***Figure 2**. Outcomes of E. coli antibiograms towards the 13 molecules listed above.*



	NA	AM	AMC	AMP	APR	CZ	ENR	FFC	CN	K	TE	TIL	SXT
S	26,1%	60,9%	43,5%	2,2%	54,3%	23,9%	21,7%	19,6%	26,1%	60,9%	4,3%	13,0%	50,0%
I+R	73,9%	39,1%	56,5%	97,8%	45,7%	76,1%	78,3%	80,4%	73,9%	39,1%	95,7%	87,0%	50,0%

Staphylococcus aureus
Le amigdale, da cui sono stati rilevati 17 dei 28 ceppi totali, si confermano il sito di elezione per l'isolamento di *S. aureus*. Dalle indagini di biologia molecolare è emerso che la quasi totalità dei ceppi (26/28) presentava il gene *mecA* codificante per la resistenza alla meticillina, mentre nessuno presentava il suo omologo *mecC*. Le metodiche di genotipizzazione MLST e SPA typing hanno identificato, rispettivamente, 4 Sequence Types (ST) e 6 Spa types (t), consentendo di raggruppare i ceppi in 7 differenti profili, il più frequente dei quali è stato ST398/t034 (Tabella 5). Infine, la PCR Multiplex per la ricerca dei geni codificanti le enterotossine stafilococciche è risultata positiva per uno solo dei ceppi testati, e ai soli geni *seg* e *sei*. Tale ceppo, oltre a presentare profilo filogenetico proprio, era anche uno dei due privi del gene *mecA*.

Tabella 5. Risultati delle analisi di genotipizzazione effettuate su *S. aureus* mediante Spa typing e MLST.
***Table 5**. Results of genotyping tests performed on S. aureus through Spa typing and MLST.*

		MULTILOCUS SEQUENCE TYPING				
		ST398	**ST2423**	**ST7245**	**ST7246**	**tot ceppi**
SPA TYPING	**t034**	16	-	-	-	**16**
	t1939	1	-	-	-	**1**
	t899	6	-	-	-	**6**
	t15045	-	1	-	-	**1**
	t1255	1	-	-	-	**1**
	t1730	-	-	2	1	**3**
	tot ceppi	**24**	**1**	**2**	**1**	**28**

DISCUSSIONE

I risultati devono essere valutati con cautela considerando il breve lasso di tempo durante il quale è stato condotto lo studio, e la relativamente limitata numerosità dei ceppi isolati ed esaminati. È quindi difficile esprimere delle considerazioni applicabili all'intera filiera produttiva. Nonostante ciò, dall'analisi critica dei risultati emergono alcuni aspetti interessanti.
Per quanto riguarda *Streptococcus suis,* tra i 35 diversi sierotipi noti e riportati in letteratura (Gottschalk and Segura, 2019) il sierotipo 2 è storicamente considerato come quello maggiormente diffuso a livello globale e più frequentemente associato a forme cliniche (Goyette-Desjardins et al., 2014). Tuttavia, negli anni, diversi studi hanno riportato un progressivo aumento delle infezioni sostenute dal sierotipo 9, che in alcuni Paesi è diventato quello maggiormente isolato da casi clinici (Willemse et al., 2019; Zheng et al., 2019), e dal sierotipo 7 (Prüfer et al., 2019). Nel presente studio, dei 23 ceppi di *S. suis* risultati tipizzabili (su un totale di 40 ceppi isolati), solo 1 apparteneva al sierotipo 2, mentre la restante quota si è quasi equamente distribuita tra i restanti sierotipi rilevabili con le metodiche adottate.
Dai risultati degli antibiogrammi, l'estesa sensibilità nei confronti delle penicilline (AMC, AMP e P; ad eccezione dell'OX) e delle cefalosporine (KF e EFT), ha confermato l'efficacia dei β-lattamici nel controllo e trattamento dell'infezione negli allevamenti suinicoli. La sensibilità verso la P, nettamente inferiore (72,5%) a quella verso AMP (87,5%), supporta l'ipotesi di una cross-resistenza incompleta nei confronti di queste due molecole. Va ricordato che l'EFT, essendo una cefalosporina di III generazione, rientra tra gli HPCIA (WHO, 2018) e, di conseguenza, andrebbe utilizzata unicamente come ultima scelta (solo a seguito di diagnosi eziologica, test di sensibilità, e resistenza alle molecole di prima e seconda scelta) nel trattamento della streptococcosi. È stata inoltre rilevata un'alta sensibilità verso gli amfenicoli (FFC) (85%). Questi risultati sono in accordo con numerosi altri studi internazionali e nazionali (Marie et al., 2002; Luppi et al., 2016a; Tonni et al., 2021; Cucco et al., 2021). Tuttavia, l'82,5% dei ceppi è risultato essere MDR, il 5% XDR ed il 2,5% PDR. Nel presente studio, infatti, *S. suis* è risultato molto spesso resistente nei confronti di tetracicline (TE), sulfonamidi (SXT), lincosamidi (PIR) e, anche se meno frequentemente, degli aminoglicosidi (K), confermando quanto già riportato in letteratura (Vela et al., 2005; Wisselink et al., 2006; van Hout et al., 2016; Du et al., 2019)aminoglycosides, enrofloxacin, novobiocin and spectinomycin. More than 87% of the S. suis isolates were resistant to tetracyclines, sulphonamides, macrolides and clindamycin. Strains of serotype 9 were significantly more resistant than strains of serotype 2 (P<0.05. Inoltre, è stata rilevata una sensibilità del 65% ai fluorochinoloni (ENR) mentre solo il 5 % dei ceppi è risultato sensibile ai chinoloni (NA). Tale riscontro è particolarmente allarmante considerata l'importanza critica di queste molecole in medicina umana.
Relativamente a *Escherichia coli,* il 45% dei ceppi isolati e risultati tipizzabili apparteneva al sierogruppo O20. Alle analisi biomolecolari, invece, è stato rilevato unicamente il fattore fimbriale *F18*, riportato in letteratura come il più frequente assieme all'*F4* (Do et al., 2020; García-Meniño et al., 2021). In accordo con Luppi et al. (2016bdue to Escherichia coli, is an important cause of economic losses to the pig industry primarily as a result of mortality and worsened productive performance. In spite of its relevance, recent data about the prevalence of virulence genes and pathotypes among E. coli isolates recovered from cases of PWD in Europe are scarce.\nRESULTS: This study investigates the prevalence of fimbrial and toxin genes of E. coli by PCR among 280 farms with PWD across Europe. A total of 873 samples collected within the first 48 h after the onset of PWD (occurring 7-21 days post weaning), 5 ceppi di *E. coli* sono stati classificati come ETEC, poiché in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie e di uno codificante per le tossine, ed 1 ceppo come STEC, poiché in possesso del gene codificante per la tossina *Stx2e* associato solo ad un fattore fimbriale.

Dagli antibiogrammi, la totalità dei ceppi è risultata essere o MDR (n=26) o XDR (n=20). In particolare, per AMP e TE, molecole appartenenti alle due classi di antibiotici più utilizzate nell'allevamento suinicolo (Lekagul et al., 2019; Bassi et al., 2021), sono stati riscontrati gli esiti peggiori, con rispettivamente il 97,8% e 95,7% dei ceppi testati risultati resistenti. Tali risultati concordano con quanto riportato dalla letteratura internazionale e nazionale (Brand et al., 2017; De Lucia et al., 2019; Do et al., 2020; Hayer et al., 2020; Renzhammer et al., 2020; Bosco et al., 2021; De Lorenzi et al., 2021)serotypes, virulence factors and genetic diversity. Serotypes were assigned by agglutination tests and virulence genes were identified by polymerase chain reaction (PCR. Anche per chinoloni (NA) e fluorochinoloni (ENR), entrambi HPCIA, è stata rilevata un'alta percentuale di resistenze, rispettivamente del 73,9% e 78,3%, con valori intermedi rispetto a quanto riportato da altri autori (Bosco et al., 2021; García-Meniño et al., 2021). Un'alta percentuale di resistenze è stata registrata anche verso un altro HPCIA, la tilosina (TIL), col preoccupante valore dell'87%. Il florfenicolo (FFC), nonostante sia considerato un nuovo agente antimicrobico per la medicina veterinaria, viene spesso riportato tra le molecole con alti livelli di resistenza, per via di meccanismi di selezione associati all'azione di elementi genetici mobili come plasmidi, trasposoni e integroni (Chapman, 2003; Blickwede and Schwarz, 2004; Rosengren et al., 2007)quaternary ammonium compounds (QAC. In accordo con questi dati, nel presente studio l'80,4% dei ceppi è risultato essere resistente verso questa molecola. Va infine sottolineata un'alta percentuale di ceppi resistenti anche nei confronti delle cefalosporine di I generazione (CZ), 76,1%, e della gentamicina (CN), 73,4%. Le restanti molecole hanno mostrato esiti migliori, ma con sensibilità mai superiori al 61% dei ceppi.
Per quanto riguarda *Staphylococcus aureus*, il 92,9% dei ceppi isolati è risultato in possesso del gene *mecA* codificante per la resistenza alla meticillina, con una prevalenza del 29,2% nei suinetti testati, in accordo con quanto già riportato in letteratura (Moreno-Flores et al., 2020). In uno studio condotto in allevamenti da ingrasso, alcuni autori (Parisi et al., 2019) hanno riportato una prevalenza del 53,5% nei suini nati e allevati in Italia, e del 90,5% negli animali importati. Inoltre, nel report EFSA (2009) emerge come in Italia il 34,9% degli allevamenti da riproduzione e il 33,9% degli ingrassi risulti positivo per MRSA. Nonostante nei suini la colonizzazione da MRSA sia frequente, raramente questi batteri sono causa di malattia (Simon et al., 2020)respectively. A total of 25 MRSA isolates were isolated from 400 samples, in 17 different fattening units. At farm, 12 out of 250 samples were positive for MRSA (4,8 %. Tuttavia, la diffusione di MRSA rappresenta un grave rischio per la salute pubblica globale (EUCAST, 2017).
Grazie alle metodiche di genotipizzazione è stato possibile raggruppare i 28 ceppi isolati in 7 differenti profili, il più frequente dei quali è risultato essere ST398/t034 (57,1%). In accordo con i dati della bibliografia nazionale (Battisti et al., 2010; Parisi et al., 2019), l'85,7% dei ceppi apparteneva al Sequence Type 398 al test MLST. Alla genotipizzazione mediante Spa typing, il t034 è risultato il più diffuso (57,1%), seguito da t899 (21,4%), Spa type che si collocano rispettivamente al terzo e quinto posto per frequenza nel report EFSA (2009). Va sottolineata, infine, la presenza di 2 ceppi con profilo ST7245/ t1730, 1 ceppo con profilo ST7246/t1730 e 1ceppo con caratteristiche molto diverse dagli altri: negativo per gene *mecA*, positivo per enterotossine stafilococciche *seg* e *sei*, con profilo genotipico ST2423/t15045. Tale risultato meriterebbe ulteriori approfondimenti filogenetici.

CONCLUSIONI

I risultati dello studio confermano l'ampia diffusione dell'AMR negli allevamenti suinicoli. Tale riscontro, considerata la rilevanza del fenomeno anche per la salute pubblica, evidenzia la necessità un approccio olistico che preveda di utilizzare protocolli diagnostici compatibili

con le necessità di campo, di adottare linee guida sull'uso razionale e consapevole del farmaco, e di promuovere la prevenzione delle malattie attraverso, ad esempio, la produzione di vaccini stabulogeni, l'implementazione della biosicurezza e il rispetto dei parametri di benessere.

In questo contesto, diventa di fondamentale importanza la promozione di filiere zootecniche *antibiotic free* anche grazie a studi, come quello appena presentato, che indaghino le principali criticità riscontrate nel loro percorso di creazione. A tal proposito, occorre sottolineare due aspetti gestionali, emersi anche nel corso del presente studio, che ricoprono un ruolo chiave per il conseguimento di tale obiettivo: (i) la necessità di implementare un valido sistema di tracciabilità e identificazione degli animali, che consenta la divisione degli animali in due gruppi distinti (trattati e non), in considerazione della comune difficoltà ad annullare l'uso degli antibiotici su tutti i suini allevati; (ii) la necessità di una efficace e capillare azione di formazione, sensibilizzazione e coinvolgimento sia degli allevatori, che lavorano quotidianamente a contatto con gli animali, sia dell'opinione pubblica. Senza il sostegno di entrambi, ogni obiettivo prefissato diventa irraggiungibile.

BIBLIOGRAFIA

1. Bassi, P., Trevisi, P., Salvarani, C., Pangallo, G., Scali, F., Luppi, A., Rugna, G., Motta, V., Diegoli, G., Merialdi, G., 2021. Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia-Romagna nel triennio 2016-2018. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 243–249.
2. Battisti, A., Franco, A., Merialdi, G., Hasman, H., Iurescia, M., Lorenzetti, R., Feltrin, F., Zini, M., Aarestrup, F.M., 2010. Heterogeneity among methicillin-resistant Staphylococcus aureus from Italian pig finishing holdings. Vet Microbiol 142, 361–366. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.10.008
3. Blickwede, M., Schwarz, S., 2004. Molecular analysis of florfenicol-resistant Escherichia coli isolates from pigs. J Antimicrob Chemother 53, 58–64. https://doi.org/10.1093/jac/dkh007
4. Bosco, C., Bonilauri, P., Rugna, G., Luppi, A., Fontana, M.C., Fiorentini, L., Bassi, P., 2021. 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. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 121–131.
5. 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, 373–380. https://doi.org/10.17236/sat00120
6. Chapman, J.S., 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. International Biodeterioration & Biodegradation, Hygiene and Disinfection 51, 271–276. https://doi.org/10.1016/S0964-8305(03)00044-1
7. CLSI_VET, 2019. M 100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 32nd Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
8. CLSI_VET, 2018a. VET01S - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
9. CLSI_VET, 2018b. VET08 - Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 4th Edition. ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
10. Cucco, L., Paniccià, M., Massacci, F.R., Morelli, A., Ancora, M., Mangone, I., Di Pasquale, A., Luppi, A., Vio, D., Rolla, U., Cammà, C., Magistrali, C.F., 2021. La caratterizzazione di Streptococcus suis isolati da focolai di malattia negli allevamenti italiani

rivela la diffusione di nuovi cloni con potenzialità zoonosica e resistenti agli antibiotivi. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 85–93.
11. De Lorenzi, G., Alborali, G.L., Baldo, V., Tonni, M., Giovannini, C., Scaburri, A., Cerioli, M.P., Bellini, S., 2021. Pattern di resistenza agli antimicrobici di ceppi di E. coli enterotossigeni (ETEC) e ceppi di E. coli commensali isolati in suinetti con diarrea neonatale. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 329–334.
12. De Lucia, A., Ostanello, F., Smith, R.P., Davies, R., Card, C., Rambaldi, M., Martelli, P., 2019. Resistenza agli antibiotici in Escherichia coli isolati in un allevamento di suini dopo la sospensione dell'utilizzo degli antibiotici. Presented at the XLV Meeting annuale SIPAS, pp. 101–108.
13. Diegoli, G., Granito, G., Luppi, A., Masera, F., Merialdi, G., Miraglia, V., Mussini, P., Trevisi, P., Trambajolo, G., 2018. LINEE GUIDA Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino 34.
14. 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, 543–552. https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.4.543
15. 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.
16. ECDC, EFSA, EMA, 2017. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals EFSA Journal 2017;15(10):5017. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5017
17. ECDC, EFSA, EMA, 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals EFSA Journal 2015;13(1):4006, 114 pp. https://doi.org/doi:10.2903/j.efsa.2015.4006
18. EFSA, 2009. Analysis of the baseline survey on the prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in holdings with breeding pigs, in the EU, 2008 - Part A: MRSA prevalence estimates. EFSA Journal 7, 1376. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1376
19. EMA, 2020. Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018. Trends from 2010 to 2018. Tenth ESVAC report.
20. EMA, EFSA, 2017. EMA and EFSA Joint Scientific Opinion, RONAFA EFSA Journal 2017;15(1):4666. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4666
21. EUCAST, 2017. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.0. ed. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing.
22. 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. Veterinary Microbiology 252, 108924. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108924
23. Gottschalk, M., Segura, M., 2019. Streptococcosis, in: Diseases of Swine. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 934–950. https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch61
24. 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. Emerg Microbes Infect 3, e45. https://doi.org/10.1038/emi.2014.45
25. Hayer, S.S., Rovira, A., Olsen, K., Johnson, T.J., Vannucci, F., Rendahl, A., Perez, A., Alvarez, J., 2020. Prevalence and time trend analysis of antimicrobial resistance in re-

spiratory bacterial pathogens collected from diseased pigs in USA between 2006-2016. Res Vet Sci 128, 135–144. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.11.010
26. Jim O'Neill, 2014. AMR Review Paper - Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance.
27. Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., Yeung, S., 2019. Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. Vet Anim Sci 7, 100058. https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058
28. Luppi, A., Bonilauri, P., Maioli, G., Gherpelli, Y., Dottori, M., 2016a. Resistenza agli antibiotici in ceppi di Streptococcus suis isolati nel suino nel periodo 2004-2014. Presented at the XLII Meeting Annuale SIPAS, pp. 133–137.
29. Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., Hidalgo, Á., 2016b. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe. Porcine Health Manag 2, 20. https://doi.org/10.1186/s40813-016-0039-9
30. Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D.L., Rice, L.B., Stelling, J., Struelens, M.J., Vatopoulos, A., Weber, J.T., Monnet, D.L., 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clinical Microbiology and Infection 18, 268–281. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
31. Marie, J., Morvan, H., Berthelot-Hérault, F., Sanders, P., Kempf, I., Gautier-Bouchardon, A.V., Jouy, E., Kobisch, M., 2002. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis isolated from swine in France and from humans in different countries between 1996 and 2000. J Antimicrob Chemother 50, 201–209. https://doi.org/10.1093/jac/dkf099
32. Ministero della Salute, 2017. Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020. Ministero della Salute Italiano.
33. Ministero della Salute, CRAN-AR, 2022. Piano di monitoraggio armonizzato sulla resistenza agli antimicrobici di batteri zoonotici e commensali ai sensi della Decisione di esecuzione (UE) 2020/1729 della Commissione del 17 novembre 2020 - Anno 2022. Ministero della Salute Italiano, in collaborazione con il Centro di Referenza Nazionale per l'Antibiotico-resistenza (CRAN-AR), c/o Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana.
34. Moreno-Flores, A., Potel-Alvarellos, C., Francisco-Tomé, M., Constenla-Caramés, L., Pérez-Roth, E., López-Cotón, C., Comesaña-Da Vila, E., Eiroa-de la Puente, L., Álvarez-Fernández, M., 2020. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus in swine housed indoors in Galicia, Spain. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica 38, 16–20. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2019.03.009
35. Parisi, A., Caruso, M., Normanno, G., Latorre, L., Miccolupo, A., Fraccalvieri, R., Intini, F., Manginelli, T., Santagada, G., 2019. MRSA in swine, farmers and abattoir workers in Southern Italy. Food Microbiol 82, 287–293. https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.03.003
36. Prüfer, T.L., Rohde, J., Verspohl, J., Rohde, M., Greeff, A. de, Willenborg, J., Valentin-Weigand, P., 2019. Molecular typing of Streptococcus suis strains isolated from diseased and healthy pigs between 1996-2016. PLOS ONE 14, e0210801. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210801
37. Renzhammer, R., Loncaric, I., Roch, F.-F., Pinior, B., Käsbohrer, A., Spergser, J., Ladinig, A., Unterweger, 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 9, 208. https://doi.org/10.3390/antibiotics9040208

38. Rosengren, L.B., Waldner, C.L., Reid-Smith, R.J., Dowling, P.M., Harding, J.C.S., 2007. Associations between feed and water antimicrobial use in farrow-to-finish swine herds and antimicrobial resistance of fecal Escherichia coli from grow-finish pigs. Microb Drug Resist 13, 261–269. https://doi.org/10.1089/mdr.2007.781
39. Simon, A.C., Baldo, V., Losio, N., Filipello, V., Colagiorgi, A., Scali, F., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A., Alborali, G.L., 2020. Molecular characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from the pig production chain in Northern Italy. Italian Journal of Food Safety 9. https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8412
40. Tonni, M., Formentini, 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., 2021. Caratterizzazione molecolare e profili di antimicrobico-resistenza di ceppi di Streptococcus suis isolati in allevamenti del nord Italia nel periodo 2013 – 2020. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 133–143.
41. Torreggiani, T., Torri, D., Maioli, G., Prosperi, A., Chiapponi, C., Bonilauti, P., Gherpelli, Y., Manfredi, R., Dottori, M., Luppi, A., 2021. Escherichia coli enterotossigeni isolati da focolai di colibacillosi enterica post-svezzamento. Presented at the XLVI Meeting annuale SIPAS, pp. 201–206.
42. van Hout, J., Heuvelink, A., Gonggrijp, M., 2016. Monitoring of antimicrobial susceptibility of Streptococcus suis in the Netherlands, 2013-2015. Vet Microbiol 194, 5–10. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.03.014
43. Vela, A.I., Moreno, M.A., Cebolla, J.A., González, S., Latre, M.V., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., 2005. Antimicrobial susceptibility of clinical strains of Streptococcus suis isolated from pigs in Spain. Vet Microbiol 105, 143–147. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.10.009
44. WHO, 2018. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. 6th Revision. World Health Organization - Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance.
45. 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. Sci Rep 9, 15429. https://doi.org/10.1038/s41598-019-51576-0
46. Wisselink, H.J., Veldman, K.T., Van den Eede, C., Salmon, S.A., Mevius, D.J., 2006. Quantitative susceptibility of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries to antimicrobial agents licensed in veterinary medicine. Vet Microbiol 113, 73–82. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.10.035
47. Zheng, H., Du, P., Qiu, X., Kerdsin, A., Roy, D., Bai, X., Xu, J., Vela, A.I., Gottschalk, M., 2019. Correction to: Genomic comparisons of Streptococcus suis serotype 9 strains recovered from diseased pigs in Spain and Canada. Veterinary Research 50, 62. https://doi.org/10.1186/s13567-019-0680-9

ANDAMENTO DEL CONSUMO DI ANTIBIOTICI IN FILIERE SUINICOLE ITALIANE CARATTERIZZATE DAL DIVERSO STATO ENDEMICO PER LA SINDROME RIPRODUTTIVA E RESPIRATORIA SUINA

PATTERN OF ANTIBIOTIC CONSUMPTION IN TWO ITALIAN PRODUCTION CHAINS DIFFERING BY THE ENDEMIC STATUS FOR PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME

AMATUCCI L.[1], RUGGERI R.[1], ROMANELLI C.[1], SANDRI G.[2], LUISE D.[1], CANALI M.[1], BOSI P.[1], TREVISI P.[1]

[1]Department of Agricultural and Food Sciences, University of Bologna, V. G Fanin 44, Bologna, Italy; [2] Società Agricola la Pellegrina s.p.a., Via Valpantena, Quinto di Valpantena, Italy

Parole chiave: suino, salute, uso antibiotici
Keywords: pig, health, antimicrobial use

RIASSUNTO
Lo studio ha mirato a quantificare l'uso di antibiotici (AB) nella fase di svezzamento (S) ed ingrasso (I) inserite in due filiere che differivano per la circolazione del virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRSV). Gli allevamenti sono stati classificati in PRRS negativi (-) o PRRS positivi (+). Gli animali di entrambe le filiere erano vaccinati contro la PRRS. I dati sull'uso di AB sono stati raccolti tra il 2017 e il 2020, ed espressi in mg di principio attivo (PA)/ kg di peso vivo prodotto. Ogni PA è stato classificato secondo lo schema proposto dall'Agenzia europea per i medicinali. I dati sui PA sono stati analizzati secondo un modello lineare in cui i fattori testati sono stati: la fase produttiva, la classificazione per PRRS e la loro interazione. I parametri di performance, età media alla fine di ogni fase produttiva, incremento ponderale giornaliero, indice di conversione alimentare, perdite totali, indice di costo e spese per i farmaci erano influenzati significativamente dallo stato endemico per la PRRS. Per le classi di antibiotico C e D è stata osservata l'interazione tra i due fattori (P=0.02, P=0.01; rispettivamente). Il consumo di antibiotici di classe C e D è stato maggiore nella fase di svezzamento rispetto all'ingrasso (P=0.07, P=0.003; rispettivamente). In conclusione, la circolazione di PRRSV ha un impatto negativo sulle performance produttive ed economiche dell'allevamento e sull'uso di AB, con un impatto maggiore sullo svezzamento.

ABSTRACT
The aim of this case study was to quantify antibiotic (AB) use in Italian weaning (W) and fattening (F) units differentiated for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) occurrence. Farms were classified as either PRRS negative (-) or PRRS positive (+). In all the farms vaccine against PRRS was provided to all the animals. Data on AB consumption were collected from 2017 to 2020 and expressed as mg of active compound (AC)/total kg of body weight (BW) produced. Each AC was classified into one of four categories according to the European Medicines Agency classification of ABs. Data regarding the ACs were analyzed using a linear model which included production phase, PRRS status and their interaction as factors. Performance parameters, average age at the end of each phase, daily live weight gain, feed to gain ratio, total losses, cost index and medication costs

were significantly influenced by the PRRS chain. For class C and D ABs an interaction between production phase and PRRS status was observed (P=0.02, P=0.01; respectively). Class C and D ABs were used more in the weaning than in the fattening phase (P=0.07, P=0.003; respectively). In conclusion, PRRS status affected the growth of pigs, economic performance and the use of ABs, with the greatest impact being on the weaning phase.

INTRODUZIONE

Dalla scoperta del virus della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (PRRSV), l'appropriato e diffuso uso dei vaccini ha ridotto la morbilità e la mortalità dei suini (1). Tuttavia, la PRRS, insieme all'influenza suina, hanno un enorme impatto economico sul settore suino (1). Per i suinetti, l'infezione da PRRSV può non essere l'unica causa di morte, ma le infezioni secondarie, giocano un ruolo altrettanto importante (2). Al fine di controllare queste infezioni, l'uso di AB concorre a limitare i danni. Tuttavia, nelle situazioni in cui l'AB è usato in medo non corretto, aumenta il rischio di selezione e diffusione di batteri multi-resistenti (2).

Tra il 2012 e il 2018 il consumo di AB nel sistema produttivo suinicolo italiano è diminuito del 10%, al contrario degli altri paesi in cui è rimasto costante. In ogni caso, l'Italia è uno dei paesi in Europa dove tutt'oggi la vendita di AB per animali da produzione è maggiore (3).

Per questi motivi, è necessario un maggiore monitoraggio sull'uso di AB, evidenziando i fattori di rischio nelle varie fasi di produzione e valutando le strategie di controllo.

Lo scopo di questo studio era quello di indagare come lo stato sierologico relativo alla PRRS influenza le performance produttive e l'uso di AB negli allevamenti da svezzamento e ingrasso italiani.

MATERIALI E METODI

I dati relativi al consumo di AB e le performance produttive sono stati raccolti dal 2017 al 2020. Per questo studio, ogni allevamento di svezzamento (S) e ingrasso (I) è stato classificato come PRRS negativo (-) o PRRS positivo (+) in base alla circolazione del virus, valutato attraverso l'uso combinato di PCR ed esami sierologici. In tutti gli allevamenti gli animali venivano vaccinati ma nei PRRS+ il livello di anticorpi circolanti contro il virus era molto alto e la malattia clinica ricorrente.

La consistenza degli animali per ogni filiera era così distribuita: S/PRRS-: 115,970 e S/PRRS+: 65, I/PRRS-: 108,248 e I/PRRS+: 54,410.

Gli indicatori di performance considerati per entrambe le fasi produttive sono stati: numero di suini alla fine di ogni fase, età, peso ad inizio e fine fase, ingestione, incremento ponderale giornaliero (IPG) e indice di conversione alimentare (ICA). Inoltre, sono stati registrati per ogni fase: perdite totali (Ptot), costi di medicazione (Cmed) e indice di costo (Icost).

Per ogni ciclo, l'uso di AB è stato espresso come mg di principio attivo (PA) per Kg di peso corporeo prodotto. Ogni principio attivo è stato classificato secondo quanto prescritto da EMA, che comprende quattro categorie: Evitare (A), Limitare (B), Attenzione (C) e Prudenza (D). La classe B include AB molto importanti per la medicina umana, possono essere utilizzati in veterinaria solo se non ci sono alternative nelle classi C e D. La classe D comprende antibiotici di prima scelta, da usare con prudenza (3).

L'uso di AB per ogni classe è stato calcolato come la somma di tutti gli AB (mg) somministrati della stessa classe, e per ognuno è stato calcolato il peso corporeo trattato. I dati di performance e del consumo di AB sono stati analizzati secondo un disegno fattoriale 2x2 considerando come fattori le due fasi di allevamento e la classificazione della filiera secondo la PRRS. I dati sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza, considerando questi due fattori principali, la loro interazione e l'effetto dell'anno di allevamento.

RISULTATI

Tabella 1. L'indice di conversione è diminuito dal 2017 al 2020. L'IPG era minore nella filiera PRRS+ rispetto a quella PRRS- (P=0.003), mentre ICA, Ptot, Icost e Cmed sono risultati significativamente inferiori nella filiera PRRS– rispetto a quella PRRS+ (P=0.009; P=0.001; P=0.008; P=0.002, rispettivamente). I parametri di performance di crescita sono stati influenzati significativamente dalla fase produttiva (P<0.01), che ha influenzato anche Icost e Cmed, risultati maggiori nella fase di svezzamento (P<0,0001, P=0.002, rispettivamente). Sono state osservate interazioni tra la fase produttiva e la filiera per Ptot, Icost e Cmed, che erano maggiori nel gruppo S/PRRS+ rispetto a S/PRRS-. I Cmed sono risultati maggiori allo svezzamento rispetto all'ingrasso nella filiera PRRS+, ciò non è stato osservato nella filiera PRRS-.

Tabella 1. Dati di produzione nelle filiere differenziate in base alla presenza della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina.
Table 1. General production data in the pig production chains differentiated by the occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.

Fase produttiva:	Svezzamento		Ingrasso		SEM	Anno				SEM	P-value			
Filiera produttiva[1]:	PRRS-	PRRS+	PRRS-	PRRS+		2017	2018	2019	2020		Filiera	Fase	F x F	Anno
Suini (mille)	116.0	65.3	108.2	54.4	6.1	84.1	79.8	81.9	98.1	6.14	<.0001	0.16	0.80	0.21
Peso iniziale, kg	7.1	6.9	32.0	31.7	0.8	18.4	18.8	21.1	19.3	0.8	0.75	<.0001	0.92	0.12
Ppeso finale, kg	32.2	31.3	170.9	168.5	1.1	99.2	100.5	101.5	101.7	1.1	0.16	<.0001	0.50	0.42
Età media, gg	55.9	59.8	199.0	203.4	1.9	132.1	130.7	126.4	128.9	1.9	0.058	<.0001	0.90	0.25
Incremento ponderale giornaliero, g	449	407	699	674	9.0	541	559	566	563	8.57	0.003	<.0001	0.36	0.23
Indice di conversione alimentare (ICA)	1.71	1.83	3.43	3.62	0.05	2.76	2.72	2.6	2.5	0.05	0.009	<.0001	0.51	0.01
Perdite totali[2]	2.55^{A}	14.49^{B}	4.64^{A}	9.04^{AB}	1.61	9.47	9.72	5.92	5.61	1.61	0.001	0.32	0.04	0.20
Indice di costo[2]	1.63^{aB}	1.91^{bB}	0.88^{A}	0.93^{A}	0.05	1.41	1.37	1.27	1.3	0.05	0.008	<.0001	0.04	0.20
Costi di medicazione[2], €/kg	0.04^{A}	0.12^{B}	0.03^{A}	0.04^{A}	0.01	0.07	0.06	0.04	0.04	0.01	0.002	0.002	0.005	0.33

[1]PRRS-: la filiera deriva da scrofe sieronegative per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina; PRRS+: la filiera deriva da scrofe sieropositive per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina.
[2]Valori con lettere diverse sono significativamente diversi con P<0,05 (minuscolo) o P<0,01 (maiuscolo).
[1]PRRS-: the production chain originated from sows seronegative for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS+: the production chain originated from sows seropositive for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome.
[2]Means with differently labeled letters are significantly different at P<0.05 (lowercase) or P<0.01 (uppercase).

Tabella 2. Il consumo di AB di classe B è risultato essere minimo sia allo svezzamento che all'ingrasso e non sono state osservate differenze tra i fattori per questa classe di AB. L'interazione tra la fase produttiva e la filiera è risultata essere significativa per la classe C e D (P=0.02; P=0.01, rispettivamente). Allo svezzamento l'uso di antibiotici di classe C e D

è risultato maggiore nella filiera PRRS+ rispetto a quella PRRS- (P<0.01), mentre nessuna differenza è stata osservata all'ingrasso. Nella filiera PRRS+ l'uso di AB della classe C e D era maggiore allo svezzamento rispetto all'ingrasso (P<0.05; P<0.01, rispettivamente), mentre nessuna differenza è stata osservata nella filiera PRRS-.

Tabella 2. Consumo di antibiotici nelle filiere differenziate in base alla presenza della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (mg di principio attivo per kg totali di carne prodotta).
Table 2. Consumption of antibiotics in the pig production chain differentiated by the occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (mg of active compound per total kg of meat produced).

Fase produttiva:	Svezzamento		Ingrasso		SEM	Anno				SEM	P-value			
Filiera produttiva[1]:	PRRS-	PRRS+	PRRS-	PRRS+		2017	2018	2019	2020		Filiera	Fase	F x F	Anno
Classe di antibiotici- B[2]														
	0.85	0.86	0.05	0.22	0.38	0.42	0.59	0.51	0.46	0.37	0.82	0.11	0.84	0.99
Classe di antibiotici - C[2,3]														
	21.7[A]	134.5[bB]	32.4[A]	54.5[a]	16.5	73.7	70.5	34.9	64.1	16.5	0.003	0.07	0.02	0.38
Classe di antibiotici - D[2,3]														
	164[A]	782[B]	57[A]	81[A]	98.0	393	342	182	167	98	0.097	0.003	0.01	0.32

[1]PRRS-: la filiera deriva da scrofe sieronegative per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina; PRRS+: la filiera deriva da scrofe sieropositive per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina.
[2]Classificazione degli antibiotici nell'Unione Europea B: Limitare; C: Attenzione; D: Prudenza
[3]Valori con lettere diverse sono significativamente diversi con P<0.05 (minuscolo) o P<0.01 (maiuscolo).
[1]PRRS-: the production chain originated from sows seronegative for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS+: the production chain originated from sows seropositive for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
[2]Classification of antibiotics in the European Union B: Restrict; C: Caution; D: Prudence
[3]Means with differently labeled letters are significantly different at P<0.05 (lowercase) or P<0.01 (uppercase).

Per la classe C, Florfenicolo e Lincomicina sono stati i PA più utilizzati sia allo svezzamento che all'ingrasso. Il Florfenicolo rappresentava il 24% e il 24,2% degli AB di classe C nelle fasi di svezzamento e di ingrasso. La Lincomicina rappresentava il 22,7% e il 32,5% dei PA di classe C nelle fasi di svezzamento e di ingrasso, rispettivamente. Per quanto riguarda la classe D, i PA più utilizzati allo svezzamento sono stati Amoxicillina (media 38,1%) e Spectinomicina (media 29,5%) mentre, all'ingrasso sono stati Ampicillina (media 21,9%) e Dicloxacillina (media 21,5%).

Figura 1. Peso relativo di suini svezzati trattato con antibiotici di classe C nelle filiere PRRS- (NEG) e PRRS+ (POS) dal 2017 al 2020.
Figure 1. Relative quantity of weaning pig weight treated with class C antibiotics in the PRRS-(NEG) and PRRS+ (POS) production chains from 2017 to 2020.

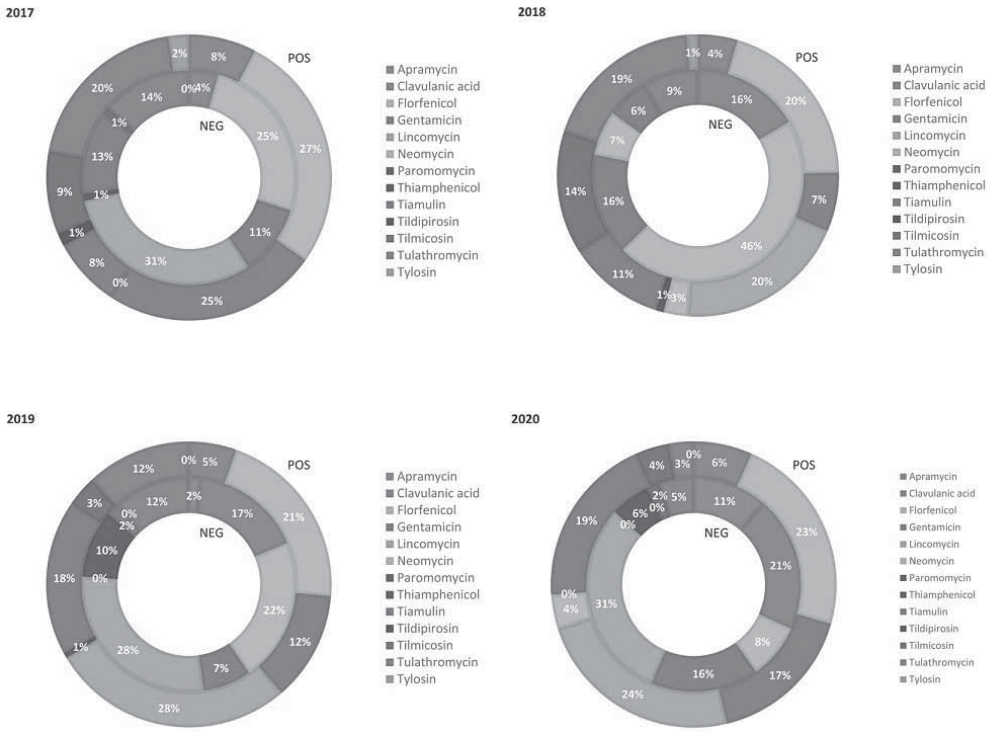


Figura 1. L'uso di Tulatromicina decresce in entrambe le filiere dal 2017 al 2020. L'Acido clavulanico aumenta molto nella filiera PRRS- dal 2017 (4%) al 2020 (21%). L'uso di Florfenicolo si è mantenuto costante nella filiera positiva ma variabile in quella negativa, con un massimo nel 2018 (46%). L'uso di Lincomicina nella filiera PRRS- si annulla nel 2018 e si rialza fino al 31% nel 2020. La Gentamicina rimane costante negli anni nella filiera PRRS-, mentre in quella positiva diminuisce molto nel 2018 per poi aumentare di nuovo nel 2020.

Figura 2. Peso relativo di suini svezzati trattato con antibiotici di classe D nelle filiere PRRS- (NEG) e PRRS+ (POS) dal 2017 al 2020.
Figure 2. Relative quantity of weaning pig weight treated with class D antibiotics in the PRRS- (NEG) and PRRS+ (POS) production chains from 2017 to 2020.

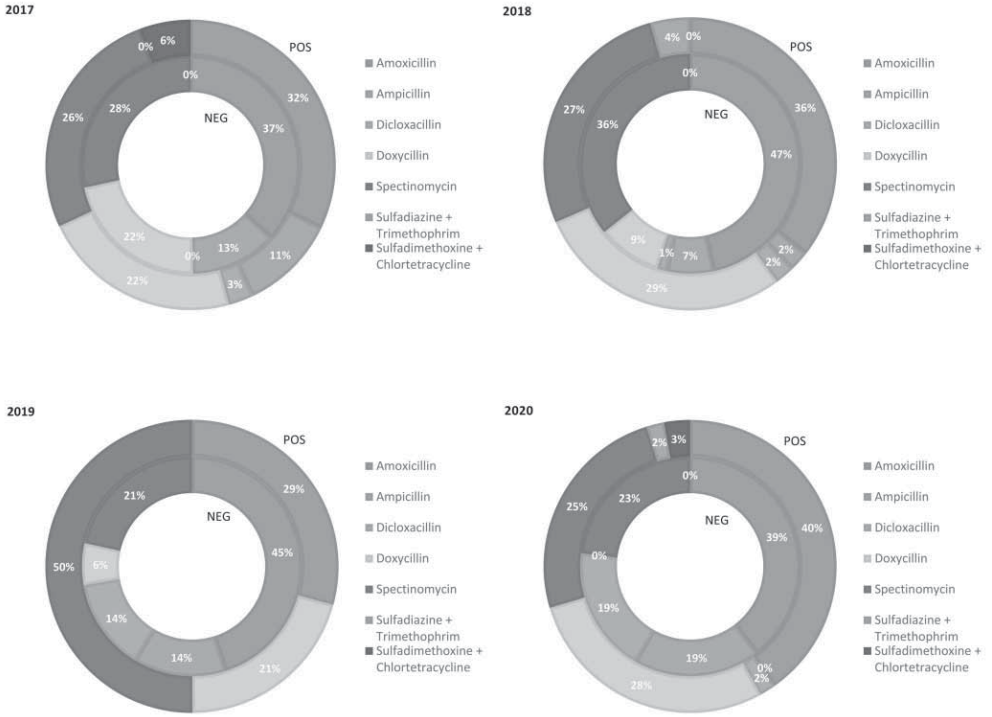


Figura 2. L'uso di Amoxicillina in entrambe le filiere è stato alto nel periodo considerato (media PRRS+: 34,25%; PRRS-: 43%). L'uso di Ampicillina nella filiera PRRS+ è diminuito fino ad azzerarsi nel 2020, mentre nella filiera PRRS- è diminuito nel 2018 e poi aumentato fino al 2020. L'uso di Dicloxacillina nella filiera PRRS- è aumentato da 0% nel 2017 fino al 19% nel 2020. L'uso di Doxicillina si è ridotto nella filiera PRRS- fino ad azzerarsi, mentre è rimasto costante nella filiera PRRS+ (media 25%). La Spectinomicina è rimasta costante nella filiera PRRS- (media 27%), mentre nella filiera PRRS+ è aumentata nel 2019 (50%) per poi diminuire nel 2020 (25%).

Figura 3. Peso relativo di suini da ingrasso trattato con antibiotici di classe C nelle filiere PRRS- (NEG) e PRRS+ (POS) dal 2017 al 2020.
Figure 3. Relative quantity of fattening pig weight treated with class C antibiotics in the PRRS- (NEG) and PRRS+ (POS) production chains from 2017 to 2020.

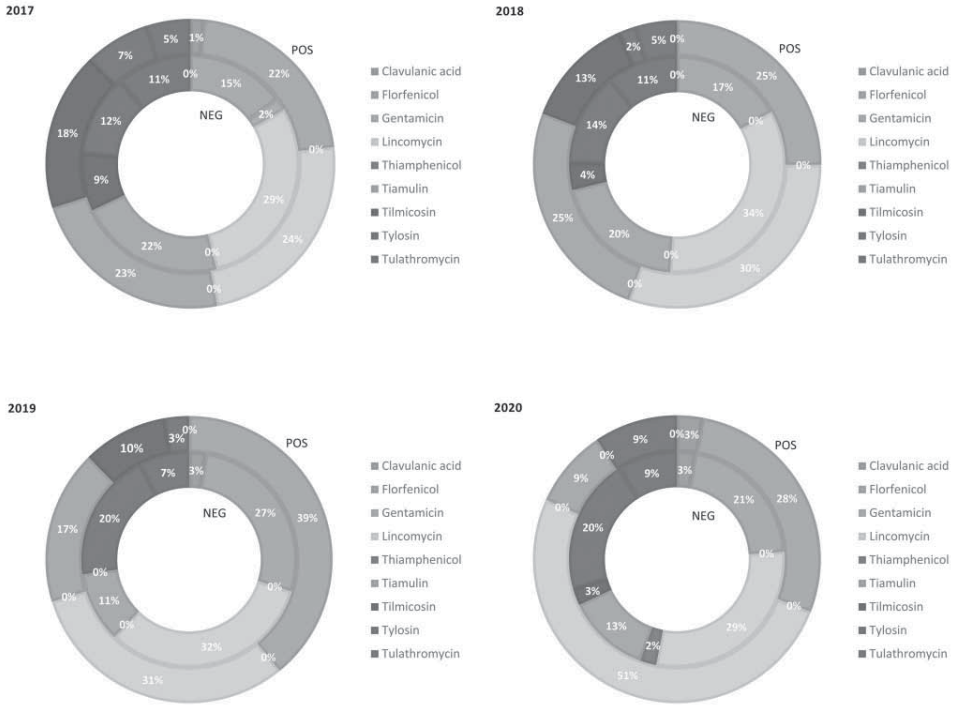


Figura 3. Nella fase di ingrasso, l'uso di Acido clavulanico, Gentamicina e Tiamfenicolo è rimasto limitato. Nella filiera PRRS- il Florfenicolo è aumento blandamente; mentre nella filiera PRRS+ è aumentato dal 2017 (22%) al 2019 (39%) per poi diminuire nel 2020 (28%). L'uso di Lincomicina è rimasto costante nella filiera PRRS- (media 31%), mentre è aumentato nel 2020 (51%) nella filiera PRRS+. L'uso di Tiamulina è diminuito in entrambe le filiere. La percentuale di Tilmicosina si è ridotta costantemente fino ad azzerarsi nel 2020, in entrambe le filiere.

Figura 4. Peso relativo di suini da ingrasso trattato con antibiotici di classe D nelle filiere di produzione PRRS- (NEG) e PRRS+ (POS) dal 2017 al 2020.
Figure 4. Relative quantity of fattening pig weight treated with class D antibiotics in the PRRS- (NEG) and PRRS+ (POS) production chains from 2017 to 2020.

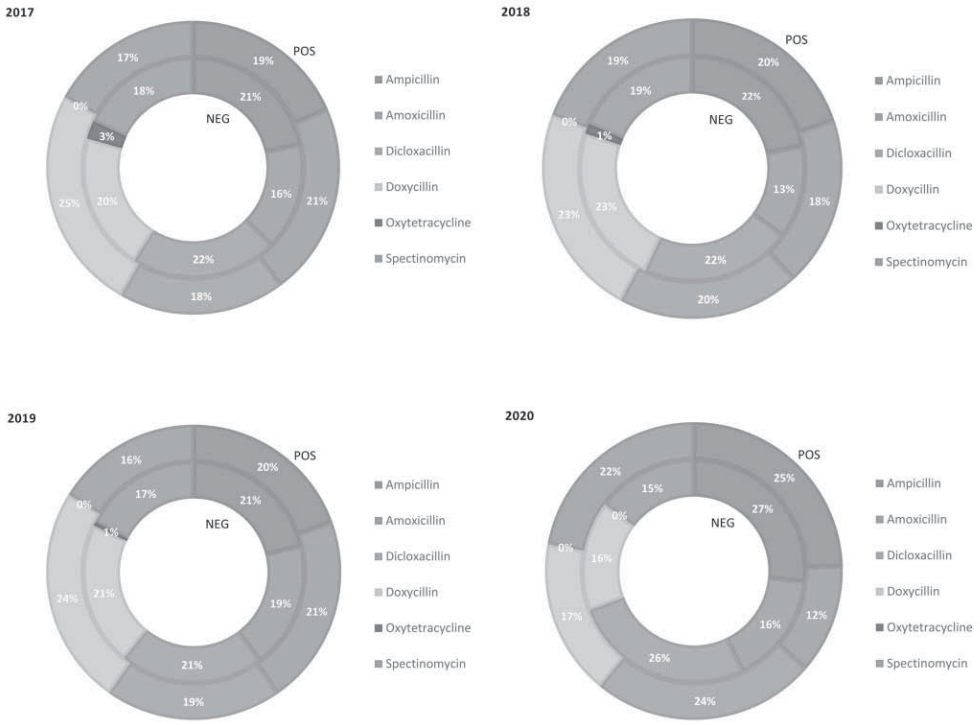


Figura 4. Nella fase di ingrasso l'uso di Ampicillina è aumentato nel tempo in entrambe le filiere. L'Amoxicillina è rimasta costante nella filiera PRRS- (media 16%), mentre nella filiera PRRS+ il suo uso è diminuito nel 2020 (12%). La percentuale di Dicloxacillina è aumentata nel 2020 (PRRS-: 26%; PRRS+: 24%). Il consumo di Doxicillina è rimasto costante fino al 2019 in entrambe le filiere e si è ridotto nel 2020 (PRRS-: 16%; PRRS+: 17%). L'uso di Spectinomicina ha subito un leggero calo nella filiera PRRS- (15%) e un aumento nella PRRS+ (22%) nel 2020.

Tabella 3. I principi attivi sono stati selezionati in base alla prevalenza di utilizzo nella filiera produttiva. La fase produttiva ha influenzato marginalmente l'uso di Amoxicillina (P=0.08), con un consumo maggiore allo svezzamento. Per Florfenicolo, è stata rilevata l'interazione tra filiera e fase produttiva (P=0.02). Allo svezzamento l'uso di Florfenicolo era maggiore nella filiera PRRS+ (P<0.01); nessuna differenza è stata rilevata per la fase d'ingrasso. La Spectinomicina è stata usata maggiormente nella fase di svezzamento rispetto all'ingrasso (P<0.0001), qualunque fosse la filiera di produzione.

Fase produttiva:	Svezzamento		Ingrasso		SEM	Anno				SEM	P-value			
Filiera produttiva[1]:	PRRS-	PRRS+	PRRS-	PRRS+		2017	2018	2019	2020		Filiera	Fase	F x F	Anno
Florfenicolo	2.2[A]	32.8[B]	1.0[A]	4.1[A]	4.7	17.1	13.1	4.81	5.1	4.7	0.006	0.01	0.02	0.25
Lincomcina	7.4	30.5	5.8	24.8	10.9	11.1	11.8	10.6	35	10.9	0.10	0.75	0.86	0.33
Amoxicillina	8.0	32.9	0.7	1.7	10.9	15.6	13.3	8.01	6.4	10.9	0.24	0.08	0.28	0.93
Spectinomicina	16.5	19.7	0.4	1.9	2.1	11.5	12.1	6.0	8.9	2.1	0.31	<.0001	0.71	0.22

Tabella 3. Consumo dei due principali PA di classe C, Florfenicolo e Lincomicina, e dei due principali PA di classe D, Amoxicillina e Spectinomicina, nelle filiere differenziate in base alla presenza della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina (mg di principio attivo per kg totali di carne prodotta).
Table 3. Consumption of two main class C ABs, Florfenicol and Lincomycin, and two main class D ABs, Amoxicillin and Spectinomycin, in the pig production chain differentiated by the occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (mg of active compound per total kg of meat produced).

[1]PRRS-: la filiera deriva da scrofe sieronegative per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina; PRRS+: la filiera deriva da scrofe sieropositive per la Sindrome Riproduttiva e Respiratoria Suina
[1]Valori con lettere diverse sono significativamente diversi con P<0.01.
[1]PRRS-: the production chain originated from sows seronegative for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome; PRRS+: the production chain originated from sows seropositive for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome
[1]Means with differently labeled letters are significantly different at P<0.01.

DISCUSSIONE

I risultati di questa ricerca hanno mostrato il legame tra la circolazione attiva del PRRSV e l'uso di antimicrobici nelle unità di svezzamento e ingrasso. Lo stato di positività per PRRS ha influenzato negativamente le prestazioni di crescita dei suini sia allo svezzamento che all'ingrasso, anche se, in quest'ultimo caso, l'impatto è stato meno evidente. Questi dati sono in accordo con Schweer et al. (5) che hanno riportato un effetto negativo sull'IPG e sull'ICA nei suini in accrescimento infettati con PRRSV. Tale effetto è stato spiegato dal peggioramento dalla efficienza digestiva. Inoltre, i dati hanno mostrato una mortalità più elevata negli allevamenti PRRS+ rispetto a quelli PRRS-. Ciò, giustifica in parte l'aumento dei costi di produzione, poiché i costi fissi sono distribuiti su un numero inferiore di suini prodotti (6). Sia il periodo dell'allattamento che quello post-svezzamento rappresentano fasi critiche nell'allevamento del suino, con il più alto rischio di infezioni. In queste fasi i suinetti sono particolarmente vulnerabili; infatti, l'uso di AB è solitamente più alto (7). Il presente studio ha evidenziato un uso maggiore di AB di classe D allo svezzamento rispetto al periodo di ingrasso, soprattutto negli allevamenti PRRS+. Inoltre, il maggiore uso di AB di classe C nella filiera PRRS+, è giustificato dal fatto che questa classe comprende antibiotici di prima

scelta per trattare patologie respiratorie o enteriche frequenti negli allevamenti e che possono essere secondarie all'infezione da PRRS (2).
In questo studio la presenza di PRRS e la fase di produzione non hanno influenzato particolarmente l'uso di Amoxicillina, la quale è utilizzata ampiamente in suinicoltura, specialmente in associazione con Acido clavulanico (8). Invece i dati raccolti evidenziano che il Florfenicolo è utilizzato maggiormente allo svezzamento nella filiera PRRS+, probabilmente in quanto efficace contro patogeni secondari al conclamarsi dell'infezione da PRRS.
Inoltre, questo studio ha riportato la riduzione dell'uso dei macrolidi (Tulatromicina e Tilmicosina) in entrambe le fasi. Ciò è in accordo con i dati di vendita nazionali rilevati tra il 2010 e il 2018 per gli animali da produzione alimentare (3). Questo dato è rilevante, considerato che ad oggi, i macrolidi sono AB di importanza critica (HPCIAs), in quanto unica scelta contro la campilobatteriosi umana (9).

CONCLUSIONI

Questo studio conferma che l'infezione da PRRSV riduce le prestazioni di crescita ed è un fattore importante che condiziona l'uso di antibiotici nel sistema di produzione suinicolo nazionale. Nei quattro anni osservati, gli AB di classe D sono stati i più utilizzati, a conferma dello sforzo del settore nel promuovere la scelta mirata dei PA da impiegare in terapia. Un limite dello studio è stata l'impossibilità di classificare le ragioni di ogni trattamento. I dati presentati, sono basati su un ampio dataset che permette di fornire una visione della realtà italiana per quanto riguarda l'uso degli AB in funzione del PRRS, endemico nel nostro sistema produttivo.

RINGRAZIAMENTI

Il progetto ROADMAP (Rethinking of Antimicrobial Decision-systems in the Management of Animal Production) ha ricevuto finanziamenti dal programma di ricerca e innovazione Horizon 2020 dell'Unione Europea sotto il Grant Agreement No. 817626.

BIBLIOGRAFIA

1. Lunney J.K., Benfield D.A., Rowland R.R.R. (2010) Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: An update on an emerging and re-emerging viral disease of swine. *Virus Research* **154**:1–6.
2. XiangjinYan, Zeng J., Li X., Zhang Z., Din A.U., Zhao K., Zhou Y. (2020) High incidence and characteristic of PRRSV and resistant bacterial Co-Infection in pig farms. *Microbial Pathogenesis* **149**:104536.
3. EMA-ESVAC (2020) Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018.Trends from 2010 to 2018. Tenth ESVAC report sales.
4. Ham P. Pursuant to Article 4 of Council Regulation (EEC) n°2081/92 dated 14th July 1992.83.
5. Schweer W., Schwartz K., Patience J.F., Karriker L., Sparks C., Weaver M., Fitzsimmons M., Burkey T.E., Gabler N.K. (2017) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus reduces feed efficiency, digestibility, and lean tissue accretion in grow-finish pigs. *Transl Anim Sci* **1**:480–488.
6. Nathues H., Alarcon P., Rushton J., Jolie R., Fiebig K., Jimenez M., Geurts V., Nathues C. (2017) Cost of porcine reproductive and respiratory syndrome virus at individual farm level – An economic disease model. *Prev Vet Med* **142**:16–29.
7. Lekagul A., Tangcharoensathien V., Yeung S. (2019) Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Vet Anim Sci.* **7**:100058.
8. Burch D.G.S., Sperling D. (2018) Amoxicillin-current use in swine medicine. *J vet Pharmacol Therap* **41**:356–368.
9. Bolinger H., Kathariou S. (2017) The Current State of Macrolide Resistance in Campylobacter spp.: Trends and Impacts of Resistance Mechanisms. *Appl Environ Microbiol* **83**:e00416-17

PUNTEGGIATURA DELLA POLMONITE NEL SUINO: METODI TRADIZIONALI E INNOVATIVI A CONFRONTO

SCORING PORCINE PNEUMONIA: A COMPARISON BETWEEN TRADITIONAL AND INNOVATIVE METHODS

ROMANO A.[1], HATTAB J.[1], BONICELLI L.[2], ROSAMILIA A.[3], LIUZZO G.[3], CAPOBIANCO DONDONA A.[4], BERNABÒ N.[5], MARRUCHELLA G.[1]

[1]Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano d'Accio, 64100, Teramo;
[2]AImageLab, University of Modena and Reggio Emilia, Via Vivarelli 10/1, 41125, Modena;
[3]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena, via S. Giovanni del Cantone 23, 41121, Modena;
[4]Farm4Trades.r.l., Via IV Novembre, 66041, Atessa, Chieti;
[5]Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agro-Alimentari e Ambientali, via R. Balzarini 1, 64100, Teramo.

Parole chiave: polmonite, punteggiatura, intelligenza artificiale
Keywords: pneumonia, score, artificial intelligence

RIASSUNTO
Le tecnologie basate sull'intelligenza artificiale, in particolare quelle in grado di analizzare immagini complesse, trovano sempre più spazio in campo biomedico. Recentemente, alcune reti neurali artificiali sono state addestrate per la punteggiatura delle lesioni pleuriche e polmonari dei suini in sede di macellazione. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le prestazioni delle reti neurali artificiali, mettendole a confronto con i punteggi assegnati da un operatore in catena di macellazione (*gold standard*). In totale, sono stati presi in esame 428 polmoni, che sono stati punteggiati secondo gli schemi tradizionali (griglie *Madec* e *Christensen*). Gli stessi polmoni sono stati fotografati ed esaminati dalla rete neurale. L'analisi dei risultati indica che la rete neurale è estremamente sensibile e specifica (valori sempre >90%), oltre che piuttosto fortemente correlata con il *gold standard* (coefficiente di *Spearman* = 0.831, $p<0.01$). In sintesi, lo studio indica che le reti neurali artificiali potrebbero essere efficacemente utilizzate nelle industrie di macellazione e incentiva ulteriori investimenti in questo ambito.

ABSTRACT
Artificial intelligence-based methods are always more frequently used in biomedical sciences, mainly in the field of diagnostic imaging. Recently, some artificial neural networks have been trained to score pleurisy and pneumonia in slaughtered pigs. The purpose of this study is to evaluate the performance of artificial neural networks, when compared with the gold standard (i.e., scores provided by skilled operators along the slaughter chain). In total, 428 lungs have been included in the present study. Each lung has been scored according to "conventional" methods (Madec and Christensen grids). Moreover, the same lungs have been photographed and scored by a trained artificial neural network. Overall, results indicate that the artificial neural network is extremely sensitive and specific (values always> 90%), with rather high correlation when compared with the gold standard (*Spearman*'s coefficient = 0.831, $p<0.01$). In summary, this study suggests that artificial neural networks could be effectively used at the slaughterhouse and stimulates further investment in this field of research.

INTRODUZIONE

Il complesso delle malattie respiratorie del suino ("*Porcine Respiratory Disease Complex*", PRDC) è motivo di ingenti perdite economiche per la suinicoltura moderna. Le lesioni polmonari e pleuriche indotte da alcuni agenti patogeni primari (es. *Mycoplasma hyopneumoniae* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*) possono persistere a lungo ed essere ancora visibili in sede di macellazione (Gottschalk, 2012; Maes et al., 2018). Pertanto, il macello può rappresentare un utilissimo punto di osservazione, potenzialmente in grado di fornire informazioni uniche su prevalenza, gravità e andamento nel tempo di specifiche patologie respiratorie a decorso cronico (Pointon et al., 1999; Scollo et al., 2017).

Nel corso degli anni, sono stati elaborati numerosi sistemi di punteggiatura ("*score*") delle lesioni osservate nei suini macellati, tutti con l'obiettivo di soddisfare le medesime esigenze: 1) facilità e rapidità di esecuzione, compatibile con la velocità della catena di macellazione; 2) capacità di fornire dati standardizzabili, di semplice interpretazione e idonei per indagini statistiche (Luppi e Merialdi, 2013). A tal proposito, hanno avuto particolare successo la "griglia S.P.E.S." per lo *score* delle pleuriti (Merialdi et al., 2012) e la "griglia *Madec*", successivamente modificata da *Christensen*, per lo *score* delle lesioni riferibili alla polmonite enzootica del suino (Madec e Derrien, 1981; Christensen et al., 1999).

Sebbene entrambe le griglie rispondano adeguatamente alle esigenze sopra specificate, la loro applicazione sistematica risulterebbe eccessivamente onerosa ed è, nei fatti, utopistica. In tal senso, le tecnologie di "*computer vision*", basate sull'intelligenza artificiale (IA), sembrano offrire interessanti prospettive. A giudicare dai contributi scientifici pubblicati nel corso degli ultimi venti anni, le "reti neurali artificiali" ("*Convolutional Neural Networks*", CNNs) rappresentano la branca dell'IA più utilizzata in ambito biomedico (Ramesh et al., 2004). Recentemente, CNNs sono state addestrate per l'identificazione e la punteggiatura delle pleuriti (Trachtman et al., 2020) e delle polmoniti (Bonicelli et al., 2021) del suino, con risultati estremamente incoraggianti.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di valutare ulteriormente le *performances* delle CNNs, mettendo a confronto la loro interpretazione delle immagini con il *gold standard* assoluto, vale a dire con i punteggi attribuiti dall'operatore presente in catena di macellazione.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato recentemente condotto in uno stabilimento di macellazione ad elevata capacità produttiva (6-8 suini/min) del Nord Italia. In totale sono stati esaminati 428 polmoni di suini "pesanti", equamente distribuiti fra destri/sinistri.

Ciascun polmone è stato fotografato con la fotocamera di uno *smartphone* (i-Phone SE) e di seguito punteggiato da un operatore. Quest'ultimo ha avuto la possibilità di palpare i polmoni, al fine di visualizzarne tutte le sue parti (compreso il lobo accessorio) e di interpretare correttamente eventuali focolai di polmonite. Le immagini sono state analizzate da una CNN precedentemente addestrata, che ha espresso la presenza di eventuali lesioni in termini percentuali, vale a dire come rapporto fra l'estensione della polmonite e la superficie totale del polmone (Bonicelli et al., 2021). I punteggi espressi dall'operatore sono stati calcolati secondo *Madec* e *Christensen* e riportati su un foglio di calcolo "*Microsoft Excel*".

I dati raccolti sono stati, infine, sottoposti ad analisi statistica. Le *performances* della CNN sono state valutate in termini di sensibilità e specificità. Inoltre, è stata calcolata la correlazione (coefficiente di *Spearman*) fra i punteggi predetti dalla CNN e quelli assegnati dall'operatore, utilizzando un modello di regressione multipla (due variabili indipendenti ed una dipendente). Infine, è stata elaborata la formula di equivalenza fra i punteggi assegnati dall'operatore e i valori predetti dalla CNN.

RISULTATI

In Figura 1 è riportato un esempio di predizione fornito dalla CNN. L'operatore ha individuato lesioni riferibili a polmonite enzootica in 177 polmoni (41.36%), interpretando come sani i restanti 251 polmoni (58,64%). Nel complesso, la CNN ha mostrato valori di sensibilità (91.63%) e specificità (95.48%) estremamente elevati rispetto al *gold standard*. Inoltre, tra i due sistemi esiste una correlazione piuttosto forte, con coefficiente di *Spearman* pari a 0.831 ($p<0.01$). La formula di equivalenza è qui riportata:

score CNN = 1.863(score *Madec*) + 0.528(score *Christensen*) –0.208

Vengono di seguito riferiti gli intervalli di confidenza (95%) per ciascun parametro: 1.863 (1.001–2.270), 0.528 (0.099–0.956), 0.208 (-0.842–0.426).

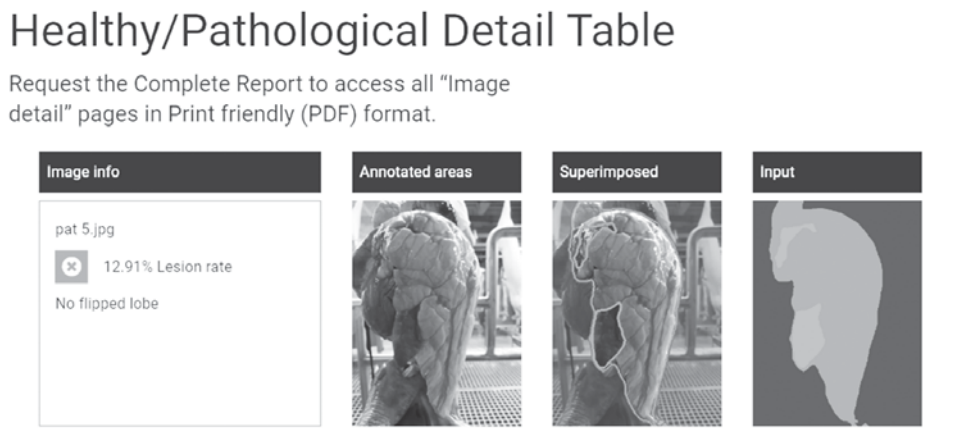


Figura 1. Polmone sinistro. La CNN ha individuato correttamente il profilo del polmone, la lesione a carico del lobo medio e una fessura in corrispondenza del lobo craniale.
Figure 1. Left lung. CNN correctly outlined the lung, pneumonia affecting the middle lobe and a scar crossing the cranial lobe.

DISCUSSIONE

Come per tutte le tecnologie basate sull'IA, le prestazioni della CNN possono sempre migliorare grazie ad un processo senza fine di "educazione continua", non molto dissimile da quello richiesto a qualunque professionista. Tuttavia, i risultati ottenuti sono già molto promettenti, anche quando confrontati con il *gold standard* di riferimento. Nella maggior parte dei casi, gli errori della CNN sono da attribuire alla presenza di fessure e di focolai di polmonite a carico del lobo accessorio (la sua localizzazione lo rende invisibile alla CNN). Anche piccole lesioni del lobo diaframmatico possono sfuggire alla lettura della CNN, rimanendo nascoste al di sotto del lobo medio. Per contro, gli errori effettivamente grossolani sono stati davvero infrequenti (un solo caso nello studio in oggetto) e causati dall'errata interpretazione di specifici artefatti.

Sibila et al. (2014) e Garcia-Morante et al. (2016) hanno sviluppato e impiegato un sistema di punteggiatura concettualmente simile a quello messo in atto dalla CNN, sebbene basato sull'annotazione manuale delle immagini da parte di un operatore in condizioni ottimali (sperimentali). Secondo gli stessi Autori, l'analisi delle immagini ha una correlazione medio-alta rispetto al punteggio assegnato con la griglia *Madec* (coefficiente di *Pearson* = 0.725), verosimilmente influenzata dalla mancata visualizzazione del lobo accessorio. In realtà, in questo caso il calcolo del coefficiente di *Pearson* non è del tutto appropriato, vista la natura discontinua dei dati ottenuti applicando la griglia *Madec*. Ciononostante, riteniamo

utile sottolineare che tale coefficiente sarebbe molto “simile” a quello ottenuto dalla CNN (coefficiente di *Pearson* = 0.754); ciò significa che la CNN è in grado di analizzare le immagini ottenute in condizioni di campo, con efficacia simile a quella di un operatore che si trovi ad agire in condizioni sperimentali.

CONCLUSIONI

I risultati della nostra indagine indicano che le tecnologie basate sull’IA – in particolare quelle in grado di analizzare immagini complesse – potrebbero essere efficacemente utilizzate nelle industrie di macellazione e incentivano ulteriori indagini ed investimenti in questo ambito.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonicelli L., Trachtman A.R., Rosamilia A., Liuzzo G., Hattab J., Mira Alcaraz E., Del Negro E., Vincenzi S., Capobianco Dondona A., Calderara S., Marruchella G. (2021) “Training Convolutional Neural Networks to Score Pneumonia in Slaughtered Pigs”. Animals 11, 3290.
2. Christensen G., Sørensen V., Mousing J. (1999) “Diseases of the respiratory system” in: Straw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. “Diseases of Swine” 8a ed., Hoboken, Wiley Blackwell, 913–940.
3. 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.
4. Gottschalk M. (2012) “Actinobacillosis” in: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Kent A.R., Schwartz J., Stevenson G.W. “Diseases of swine” 10a ed., Ames, Wiley Blackwell, 653–669.
5. Luppi A., Merialdi G. (2013) “Lesioni al macello” in: Martelli P. “Le patologie del maiale”, Milan, Point Veterinaire Italie, 199-217.
6. Madec F., Derrien H. (1981) “Fréquence, intensité et localization des lesion pulmonaires chez le porc charcutier: Resultants d’unepremiéreséried’observationsen abattoir” J Rech Porc Fr. 13, 231–236.
7. Maes D., Sibila M., Kuhnert P., Segalés J., Haesebrouck F., Pieters M. (2018) “Update on Mycoplasma hyopneumoniae infections in pigs: Knowledge gaps for improved disease control” Transbound Emerg Dis. 65, 110–124.
8. 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.
9. Pointon A.M., Davies P.R., Bahnson P.B. (1999) “Disease surveillance at slaughter” in: Straw B.E., D’Allaire S., Mengeling W.L., Taylor D.J. “Diseases of Swine”, 8a ed., Hoboken, Wiley Blackwell, 1111–1132.
10. Ramesh A.N., Kambhampati C., Monson J.R., Drew P.J. (2004). “Artificial intelligence in medicine”. Ann R Coll Surg Engl., 86, 334–338.
11. Scollo A., Gottardo F., Contiero B., Mazzoni C., Leneveu P., Edwards S.A. (2017) “Benchmarking of pluck lesions at slaughter as a health monitoring tool for pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs)” Prev Vet Med., 144, 20–28.
12. Sibila M., Aragon V., Fraile L., Segalés J. (2014) “Comparison of four lung scoring systems for the assessment of the pathological outcomes derived from Actinobacillus pleuropneumoniae experimental infections” BMC Vet Res., 10, 165.
13. Trachtman A.R., Bergamini L., Palazzi A., Porrello A., Capobianco Dondona A., Del Negro E., Paolini A., Vignola G., Calderara S., Marruchella G. (2020). “Scoring pleurisy in slaughtered pigs using convolutional neural networks”. Vet Res., 51, 51.

GESTIONE IN ALLEVAMENTO DELLA MALATTIA DEGLI EDEMI ATTRAVERSO L'UTILIZZO DI STATISTICHE DI PROCESSO PER IL MONITORAGGIO ROUTINARIO DELLA PRODUZIONE

MANAGING SHIGA TOXIN-PRODUCING E. COLI USING STATISTICAL PROCESS CONTROL CHARTS FOR ROUTINE HEALTH AND PRODUCTION MONITORING IN PIG FARMING

SCOLLO A.[1*], RUSINÀ A.[1], CAVAZZONI A.[2], MAZZONI C.[2], COSSETTINI C.[3]

[1]*Department of Veterinary Sciences, University of Torino, 10095 Grugliasco, Torino, Italy;*
[2]*Swivet Research sas, 42123 Reggio Emilia, Italy;*
[3]*Chemifarma spa, 47122 Forlì, Italy*

Parole chiave: Shiga toxin; Escherichia coli; malatia degli edemi; suino; statistica di processo
Keywords*: Shiga toxin; Escherichia coli; oedema disease; pig; statistical process control*

RIASSUNTO
La malattia degli edemi (ED) causata da *E.coli* produttori di Shiga tossine è una patologia potenzialmente fatale nei suini, in particolare per i suinetti allo svezzamento. Quando in un allevamento viene applicato un protocollo di prevenzione, l'interpretazione della sua efficacia spesso è complicata nelle condizioni di campo a causa della variabilità naturale o per "altra causa comune". Per questa ragione, in questo studio è stato usato un approccio basato su un controllo statistico di processo (SPC) per valutare in modo retrospettivo l'applicazione di un protocollo di prevenzione per l'ED (dieta a basso contenuto proteico, *fibra ad-libitum*, vaccinazione a 5 giorni di età) in un sito commerciale di svezzamento dei suinetti infetto. L'analisi è stata condotta in un periodo di 9 anni (n= 75 lotti, 1800 suinetti svezzati per lotto) utilizzando la mortalità come parametro chiave per la salute e la produzione per ogni lotto; la statistica e i limiti di controllo (media ± 3 volte sd, UCL, limite di controllo superiore; LCL, limite di controllo inferiore) sono stati basati sui dati ottenuti dai primi 28 lotti (Periodo 1) prima dell'esordio del primo segno clinico di ED. I grafici permettono l'individuazione di lotti definiti fuori controllo (i.e., con la mortalità fuori dai limiti di intervento) dal lotto 29 in poi esplorando un Periodo 2 (produzione instabile e segni clinici di ED, 36 lotti) e un Periodo 3 (applicazione del protocollo di prevenzione; 11 lotti). La valutazione della mortalità attraverso l'utilizzo dell'SPC ha rivelato un sistema di produzione definito sotto controllo (media della barra dell'intervallo mobile =1,34%; UCL=4,37%; LCL=0%) durante il Periodo 1. Durante il Periodo 2, i grafici hanno perso lo stato di controllo statistico, come mostrato da diversi segni di variazione per causa speciale causati dal focolaio di ED. Il Periodo 3 è stato caratterizzato nuovamente da uno stato di controllo statistico in cui non sono stati rilevati segni di variazione per causa speciale. In conclusione, l'applicazione retrospettiva dei grafici SPC nel presente studio ha permesso di confermare l'efficacia di un protocollo di prevenzione per l'ED nel ridurre la mortalità in un sito di svezzamento. I grafici SPC sono consigliati come utile strumento per fornire informazioni sulle relazioni fra decisioni in merito alla salute, al benessere e al management e alcuni indicatori iceberg selezionati negli animali da allevamento.

ABSTRACT
Oedema disease (ED) caused by Shiga-toxin-producing E. coli in pigs is a serious life-threatening disease, particularly among weaned piglets. When a preventive protocol is adopted

in a specific farm, interpretation of effectiveness is often complicated in field conditions due to natural or "common cause" variation. For this reason, in this study a Statistical process control (SPC) approach was used to retrospectively evaluate the application of an ED preventive protocol (lower protein diet, ad-libitum fiber, vaccination at 5 days of age) in an infected commercial piglets' weaning site. The analysis was established over a 9-years period (n=75 consecutive batches; 1800 weaners per batch) using mortality for each batch as the key parameter of health and production; the statistics and the control limits (mean ±3-fold sd; UCL, upper control limit; LCL, lower control limit) were based on data from the first 28 batches (Period 1) before the onset of the first ED clinical signs. The charts allowed the detection of defined out of control batches (i.e., with mortality out of the intervention limits) from batch 29 ongoing, exploring a Period 2 (unstable production and ED clinical signs; 36 batches) and a Period 3 (application of the ED preventive protocol; 11 batches). Mortality evaluation using SPC revealed a production system defined under-control (mean moving range bar = 1,34%; UCL = 4,37%; LCL = 0%) during Period 1. During Period 2, charts lost the state of statistical control, as showed by several signals of special cause variation due to the ED outbreak. Period 3 was characterized again by a state of statistical control, where no signals of special cause variation was showed. In conclusion, the retrospective application of SPC charts in the present study was able to confirm the efficacy of an ED preventive protocol in reducing mortality in a piglets' weaning site. SPC charting is suggested as a useful tool to provide insights into relationships between health, managerial, and welfare decision and some selected iceberg parameters in livestock.

INTRODUZIONE

La malattia degli edemi (ED) nei suini è causata da *E.coli* (STEC) produttori di Shiga tossine, conosciuti anche come *E.coli* della malattia degli edemi. Questi ceppi di *E.coli* sono caratterizzati dalla capacità di produrre Shiga tossine 2e (Stx2e), che entrano nel circolo sanguigno e danneggiano le pareti dei vasi determinando edema nei tessuti target e causando una malattia potenzialmente fatale in particolare fra i suinetti allo svezzamento. Gli animali che soffrono di malattia degli edemi mostrano edema, deperimento, disturbi neurologici come atassia o paralisi e in casi gravi la morte improvvisa. Una volta che un allevamento si infetta è difficile eliminare la ED e lo stesso ceppo è solitamente ritrovato in diversi lotti consecutivi di suini, questo può risultare in ingenti danni per gli allevatori di suini. Il trattamento antibiotico è ancora l'approccio terapeutico più largamente utilizzato per migliorare la salute dei suinetti quando questi mostrano sintomi di ED, ma spesso è tardi per salvarli in quanto la tossina si è già diffusa nell'organismo. Comunque, l'utilizzo di antibiotici a scopo profilattico sugli altri suinetti in salute o come additivo alimentare per ridurre la colonizzazione di batteri patogeni nell'intestino è controverso dal momento che è risaputo che determina l'aumento di batteri resistenti agli antibiotici, i quali causano una grande preoccupazione nel settore suinicolo. Per questo motivo, e per il bando dell'ossido di Zinco come alternativa per il controllo delle infezioni da *E.coli*, è necessario lo sviluppo di un altro approccio preventivo efficace. L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) ha inoltre enfatizzato il bisogno di prevenire le malattie infettive negli animali attraverso diverse misure classificate in tre categorie: buona zootecnia, biosicurezza efficace e vaccinazione. Ad esempio, sono ritenute efficaci per il controllo delle infezioni da *E.coli* alcune strategie di gestione dell'alimentazione, come la riduzione dell'assunzione di cibo, di proteina grezza ed energia digeribile e una dieta con un alto contenuto di fibre.

Quando viene adottato un protocollo di prevenzione in specifici allevamenti è essenziale monitorare la sua efficacia sulla salute dei suini e sul processo di produzione.

Sfortunatamente, l'interpretazione dell'efficacia spesso è complicata nelle condizioni di campo a causa della variabilità naturale o "di causa comune". I grafici di controllo statistico di processo (SPC), inventati negli anni '20 del XX secolo e usate nell'industria per diversi anni, forniscono un approccio statistico che può essere utile anche nel campo della sanità umana e produzione animale.
Gli strumenti importanti dell'SPC includono diagrammi di controllo, come il grafico a valori individuali (I-chart) e il grafico *moving-range* (MR-chart).
Un diagramma SPC è un grafico cronologico dei dati di un processo (i.e. i parametri di interesse registrati regolarmente nel tempo) con una linea centrale (solitamente la media) e dei limiti di controllo superiori e inferiori definiti statisticamente. Se tutti i valori del processo ricadono nell'intervallo fra il limite superiore e il limite inferiore il processo si considera sotto "controllo statistico". Se i valori del processo ricadono al di fuori dei limiti o mostrano un particolare trend o una variazione (e.g. un progressivo aumento o riduzione dei valori dalla linea centrale) questo fornisce la prova di una variazione causa "speciale". I diagrammi SPC di dati storici possono determinare se un processo è stato sotto "controllo statistico", possono essere usati in modo prospettico per svelare variazioni di processi dopo l'introduzione di una nuova procedura nella catena di produzione e della sua efficacia e, quando un grafico indica l'istituzione di un diverso livello di performance, possono essere usati per calcolare una nuova linea centrale e nuovi limiti. La I-chart e la MR-chart vengono utilizzate in caso di dati continui e non raccolti in sottogruppi.
La I-chart visualizza i dati singoli e monitora la media e lo shift nel processo, mentre l'MR-chart monitora la variabilità. Nella sanità umana, le carte di controllo SPC sono state utilizzate per distinguere cambiamenti che apportano miglioramenti da quelli che non ne apportano attraverso la visualizzazione e l'analisi delle performance di un processo nel tempo (inclusi processi biologici come omeostasi della pressione sanguigna o processi organizzativi come l'assistenza ai pazienti in ospedale), a volte in tempo reale. Nel settore suinicolo, i grafici SPC sono stati usati per rivelare cambiamenti nei processi di produzione in seguito a focolai di Sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS) o in seguito a vaccinazione. Le regole di decisioni derivanti dalla statistica aiutano gli utenti a determinare se la performance di un processo sia stabile e prevedibile o se ci sia una variabilità in essa che renda il processo instabile e imprevedibile, influenzando la fase decisionale. Una fonte di questa variabilità può essere un intervento di successo per un fine di miglioramento che cambia la performance in meglio. Se il miglioramento si mantiene, il processo si stabilizzerà nuovamente al nuovo livello di performance.
Nel presente studio, i dati relativi alla mortalità in un sito per lo svezzamento dei suinetti sono stati tracciati in modo retrospettivo per un periodo di produzione di 9 anni con l'obiettivo di: (I) applicare i grafici SPC negli animali da allevamento come strumenti di monitoraggio della salute dei suini attraverso un parametro chiave; (II) verificare l'efficacia di un protocollo di prevenzione per l'ED nel tempo.

MATERIALI E METODI

Animali e Strutture

Lo studio ha avuto luogo in un sito per lo svezzamento di tipo commerciale situato in Lombardia. Il sito per la riproduzione, con 1200 scrofe, che fornisce i suinetti per il sito di svezzamento è dello stesso proprietario, dista 4 chilometri ed è organizzato a bande trisettimanali seguendo le procedure di tutto pieno-tutto vuoto. I suinetti sono stati svezzati alle 4 settimane di età, spostati nel sito per lo svezzamento ogni 6 settimane (un gruppo all'interno, uno nell'altro sito) e accasati nella *nursery* per 11 settimane.

La nursery include 2 settori identici completamente separati, con 8 stanze identiche contenenti 8 box ciascuna; è stato assegnato un lotto ad ogni settore ed è stato gestito con la procedura del tutto pieno-tutto vuoto. I parametri ambientali della nursery sono stati impostati in base alle esigenze dei suinetti. Durante l'intero studio l'allevamento era positivo ma stabile per la PRRS, positivo per *Mycoplasma hypopneumoniae* e positivo al Circovirus suino di tipo 2 (PCV2) ma in assenza di segni clinici. I suinetti erano vaccinati per *Mycoplasma hypopneumoniae* e PCV2. Agli animali veniva fornita un'alimentazione secca *ad libitum.*

Raccolta Dati

Da gennaio 2013 ad agosto 2021 sono stati registrati i casi di animali morti per ogni lotto. Dopo la prima registrazione della mortalità svolta da un allevatore formato, è stata eseguita una verifica formale da parte dell'ufficio di produzione, il quale ha verificato il numero di animali venduti sul totale dei suini arrivati per ogni lotto.

ED Status, Strategie di Alimentazione e Interventi

Periodo 1: Produzione Sotto Controllo: da gennaio 2013 a maggio 2016 (28 lotti) in allevamento non sono stati rilevati segni clinici ascrivibili a una infezione da STEC. I suinetti sono stati alimentati con un mangime commerciale che includeva ZnO (2,500 ppm) per i primi 14 giorni. Il mangime starter aveva un contenuto del 21% di proteina grezza e 5,5% di fibra.

Periodo 2: Produzione Instabile e Segni Clinici di ED: il sito per lo svezzamento ha iniziato a mostrare segni clinici di ED da giugno 2016 (36 lotti). La malattia è stata diagnosticata sulla base dei segni clinici (sintomatologia nervosa e morte improvvisa), lesioni anatomopatologiche (edema gelatinoso a livello del cardias, mesocolon, mesentere del piccolo intestino e cistifellea) e analisi di laboratorio. L'infezione da STEC è stata identificata attraverso il ritrovamento di geni codificanti per i fattori di virulenza Stx2e e le fimbrie F18 con qPCR multiplex (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna) da campioni di contenuto digiunale. Tutti i suinetti venivano alimentati con lo stesso mangime commerciale del Periodo 1. Come suggerito dall'antibiogramma, è stata somministrata gentamicina (4 mg/kg di peso corporeo) per 5 giorni nell'acqua di bevanda dopo l'accasamento di ogni lotto. In caso di scarso miglioramento clinico sono tati somministrati altri trattamenti antibiotici senza un protocollo fisso (colistina o apramicina, entrambi sensibili da antibiogramma).

Periodo 3: Il Protocollo di Prevenzione per l'ED: da maggio 2020 al giorno dell'analisi dei dati (11 lotti) l'allevamento ha adottato un protocollo di prevenzione per l'ED: (I) Ai suinetti è stato somministrato mangime commerciale contenente ancora ZnO (2,500 ppm) per i primi 14 giorni, ma con un più basso contenuto di proteina grezza (17%); (II) A tutti i box è stata garantita una somministrazione continua di fibra attraverso la fornitura di paglia lunga in rastrelliere; (III) Gli animali sono stati vaccinati contro l'ED (Ecoporc SHIGA®, CEVA Salute Animale, Agrate Brianza, Italia) nella sala parto. Ai suinetti è stata fatta una singola somministrazione attraverso un'iniezione intramuscolare (1mL) dell'antigene 2stx2e geneticamente modificato per l'immunizzazione attiva dei suinetti a partire dai 4 giorni di età (25).

Creazione dei Grafici

I dati sulla mortalità per ogni lotto sono stati inseriti in un foglio Excel. I grafici SPS sono stati creati utilizzando il programma SPC IV Excel (quality America, Inc.). La mortalità, indicatore di performance del processo, è stata calcolata come la proporzione (espressa come percentuale) di suinetti morti in ogni lotto specifico. Seguendo il consiglio di Wheeler and Poling's sono stati utilizzati grafici individuali e a intervallo mobile (I-MR charts).

Il grafico individuale mostra misurazioni del singolo lotto. Il grafico *moving-range* mostra il

valore assoluto della differenza fra misure consecutive. Su un grafico I-MR la linea centrale (*Process Center Line*, PCL) rappresenta la media dei valori utilizzati per il calcolo dei limiti di controllo. I limiti superiori di allerta (*Upper Warning Limits*, UWL) e i limiti inferiori (*Lower Warning Limits*, LWL) sono stati calcolati utilizzando due deviazioni standard. Il superamento di UWL e LWL indica che il processo sta cambiando e necessita di attenzione (segnali di allerta). I limiti superiori di controllo (*Upper Control Limits*, UCL) e i limiti di controllo inferiori (*Lower Control Limits*, LCL) sono stati calcolati utilizzando tre deviazioni standard sopra e sotto la linea centrale e, quando superati, il processo è stato considerato drasticamente fuori controllo.
Le procedure per stabilire i limiti nei grafici I-MR sono quelle suggerite da Sanghangthum et al. Il software etichetta i punti rilevanti con il numero del test che segnala l'evidenza di una variazione per causa speciale. La mortalità media (%) durante ciascuno dei 3 periodi è stata calcolata attraverso un'analisi descrittiva.
Sono stati eseguiti tutti gli otto test per cause speciali di variabilità disponibili nel SPC IV Excel ed elencati qui di seguito:
Test 1: 1 punto oltre 3 deviazioni standard (fuori dal segnale di controllo)
Test 2: 9 punti successivi sullo stesso lato del PLC (segnale di allerta)
Test 3: 6 punti successivi in crescita o in calo (segnale di allerta)
Test 4: 14 punti successivi con alternanza up e down
Test 5: 2 su 3 punti successivi oltre 2 deviazioni standard (stesso lato, segnale di allerta)
Test 6: 4 su 5 punti successivi oltre 1 deviazione standard (stesso lato, segnale di allerta)
Test 7: 15 punti successivi all'interno di 1 deviazione standard (entrambi i lati, segnale di allerta)
Test 8: 8 punti successivi non all'interno di 1 deviazione standard (entrambi i lati, segnale di allerta)

RISULTATI

I dati relativi alla mortalità nel sito per lo svezzamento sono stati raccolti per 75 lotti di suinetti. La media della mortalità era del 2,26% nel Periodo 1, 5,54% nel Periodo 2, e 3,32% nel Periodo 3. La **Figura 1** mostra i grafici I-MR dove le 28 osservazioni ottenute nel Periodo 1 sono state utilizzate per impostare la linea centrale e i limiti utilizzati anche nel Periodo 2 e 3; i punti cerchiati mostrano un segnale di allerta di causa speciale di variabilità, i punti cerchiati e incorniciati sono i punti fuori controllo nel processo. I dettagli in merito ai segnali di avviso di variazione per causa speciale e punti fuori controllo nel processo sono riportati da Scollo et al. (2022). La porzione di grafico MR che mostra le 28 osservazioni del Periodo 1 suggerisce che il processo ha operato in uno stato di controllo statistico (media della barra dell'intervallo RBAR=1,34%; UCL=4,37%; LCL=0%); il grafico I dello stesso periodo (PCL=2,26%; UCL=5,81%; LCL= -1,30%) ha reso due segnali di allerta di variazione per causa speciale attraverso il test 6, seguiti da ulteriori segnali dal lotto 17 in poi. La frequenza dei segnali fuori controllo nel grafico I è stata del 7,14%. Dal momento che nessun segnale di variazione per causa speciale è emerso nel grafico MR nel Periodo 1, la linea centrale e i limiti basati su queste osservazioni sono stati utilizzati per estendere il grafico per monitorare la performance anche nel Periodo 2 e 3. Dal lotto 29 in poi (Periodo 2), il grafico MR ha perso lo stato di controllo statistico come mostrato da diversi segnali di variazione per causa speciale, rispecchiati dallo stesso numero di test positivi nel grafico I (tabella 1).
La frequenza dei segnali fuori controllo nel grafico I è stata del 36,11%. Il Periodo 3 è stato caratterizzato da un nuovo stato di controllo statistico dal momento che non ha mostrato alcun segnale di variazione per causa speciale nel grafico I dal lotto 67 in poi.
La frequenza dei segnali fuori controllo nel grafico I è stata dello 0%.

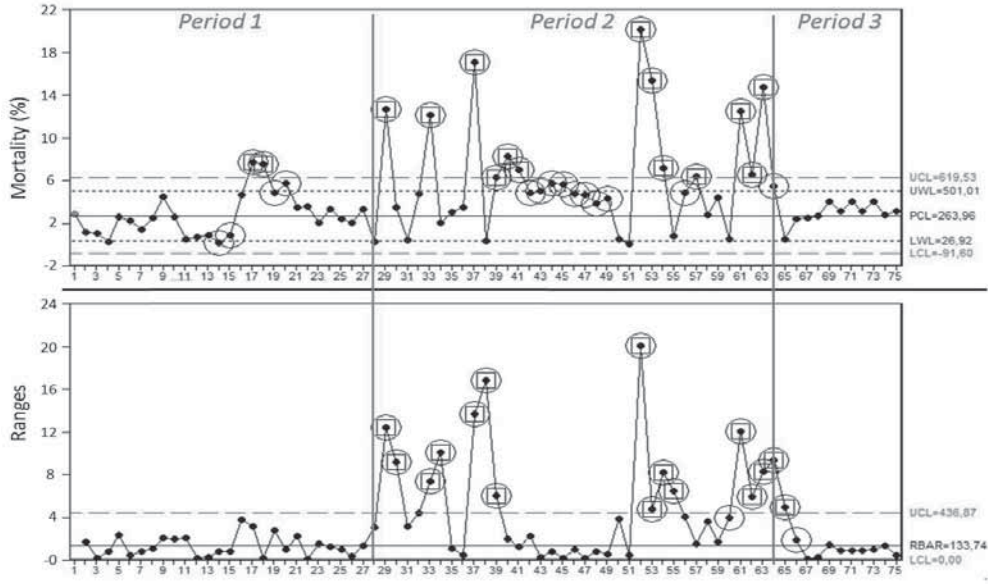


Figura 1: Grafici I-MR per la mortalità (%) in ciascun lotto ottenuti dall'analisi di 3 Periodi (Periodo 1=1-28; Periodo 2=29-63; Periodo 3=64-75). Linea centrale di processo (PCL, linea nera), limite superiore di controllo e limite inferiore (UCL, LCL, linee tratteggiate rosse) e limite di allerta superiore e limite di allerta inferiore (UWL, LWL, linea tratteggiata blu) sono stati calcolati sulla base delle osservazioni nel Periodo 1. I punti cerchiati mostrano almeno un segnale di variazione per causa speciale come espresso dai test del software. I punti cerchiati e incorniciati sono fuori controllo nel processo.

Figure 1. *I-MR charts for mortality (%) in each batch obtained from the analysis of the 3 Periods (Period 1 = 1-28; Period 2 = 29-63; Period 3 = 64-75). Process centre line (PCL, black line), upper control limit and lower control limit (UCL, LCL, red dotted lines), and upper warning limit and lower warning limit (UWL, LWL, blue dotted lines) were calculated based on observations of Period 1. Circled points showed at least one signal of special cause variation, as expressed by software tests. Circled and framed points showed to be out of control in the process.*

DISCUSSIONE

La malattia degli edemi causata da ceppi di *E.coli* produttori di Stx2e può rivelarsi un problema economico rilevante in un allevamento di suini. Il costo dei focolai ad essa associati dipende principalmente dal tasso di mortalità oltre al peso dei suini che muoiono (più è cresciuto il suino, più sono dispendiose le conseguenze). Inoltre, si sospetta un possibile effetto immunosoppressivo dato dalla tossina Stx2e, che può influire sul corretto sviluppo dei suinetti. La vaccinazione e l'intervento sulla dieta sono considerate le principali alternative all'utilizzo di antibiotici che potrebbero iniziare la selezione per l'antibiotico resistenza per la protezione dei suinetti contro la malattia. In questo studio, è stato utilizzato un vaccino contro le Stx2e ed è stata somministrata una dieta con una riduzione dal 21% al 17% di proteina grezza in un allevamento in cui era stata precedentemente confermata la presenza di STEC.

I dati relativi alla mortalità sono stati raccolti per un periodo di 9 anni da gennaio 2013, periodo in cui l'allevamento è andato incontro a tre *status* differenti: produzione definita sotto controllo (Periodo 1), produzione instabile e segni clinici di ED (Periodo 2) e applicazione del protocollo di prevenzione per l'ED (Periodo 3). Durante il Periodo 1 erano presenti alcuni segnali di variazione per causa speciale nella mortalità, 2 su 6 indicavano un miglioramento nel processo di produzione, come mostrato da 5 lotti consecutivi in cui la mortalità media è stata più bassa di 1 deviazione standard dalla media. Gli altri 4 segnali di variazione per causa speciale erano inattesi e impossibili da ascrivere a una causa sottostante a causa del lungo tempo trascorso fra la raccolta dati e l'analisi di questi ultimi, ma la variazione non ha influenzato negativamente il processo di analisi come confermato dal grafico MR che è rimasto sotto controllo. A giugno 2016, quando l'allevamento ha iniziato a mostrare segni clinici ascrivibili ad ED, la mortalità media è aumentata dal 2,26% al 5,54%. Oltre ai numerosi lotti che mostravano una grave mortalità con picchi di molto superiori all'UCL e diversi segnali di allerta di un peggioramento del processo di produzione (8 punti consecutivi con una mortalità media >1 deviazione standard dalla media), un ulteriore rilevante indicatore di un sistema fuori controllo è stata la persistente ed eccezionale variabilità nella mortalità lotto dopo lotto come mostrato nel grafico MR e l'aumento dei segnali fuori controllo da 7,14 a 36,11%. L'enorme fluttuazione della mortalità che ha caratterizzato il Periodo 2 potrebbe confermare il pattern vario e complesso che porta alla malattia degli edemi, dove la semplice presenza degli ETEC non è sempre sufficiente da sola a causare la comparsa dei segni clinici. Si sa che è inoltre necessario considerare altri effetti fisiologici, ambientali e relativi alla dieta che possono a volte essere tanto importanti quanto i batteri ETEC stessi: cambiamenti nell'alimentazione, svezzamento precoce, flusso continuo di suini attraverso le strutture, igiene o malattie virali respiratorie. Gli allevamenti positivi solitamente sperimentano il problema indefinitamente, con sporadici periodi di apparente miglioramento. L'applicazione di un protocollo di prevenzione per l'ED a maggio 2020 ha permesso di ridurre nuovamente la mortalità al 3,32% aumentando la stabilità della produzione a livelli superiori rispetto anche al Periodo 1 come espresso da 9 punti consecutivi sotto la RBAR del grafico MR e dalla ridotta frequenza di segnali di fuori controllo (0%). Questo è in accordo con Mesonero-Escuredo et al. che hanno osservato una mortalità significativamente più elevata nei suinetti svezzati non vaccinati rispetto al gruppo dei vaccinati, con un rischio relativo di morire/venire abbattuto per un suinetto del gruppo non vaccinato di circa 5 volte superiore rispetto a uno del gruppo vaccinato. Inoltre, le modifiche all'alimentazione adottate nel presente lavoro (fornitura continua di fibra e dieta a minore contenuto proteico) modulano i recettori fimbriali che possono essere coinvolti in una ridotta colonizzazione da parte di *E. coli* dopo lo svezzamento e possono diminuire la produzione di metaboliti proteici tossici.

Altri autori hanno applicato i grafici SPC in ambito zootecnico come metodo statistico per un'analisi aggregata di più allevamenti ma gli studi si sono concentrati sul potenziale per le singole aziende quando applicati sul campo non sono comuni. Questo è il primo utilizzo di grafici SPC come strumento per il monitoraggio della salute dei suini attraverso un parametro chiave in un sito per lo svezzamento colpito da malattia degli edemi. Due temi principali sono emersi nel presente studio: in primo luogo l'applicazione del protocollo di prevenzione per l'ED è stato efficace nel ridurre la mortalità nel sito di svezzamento e l'analisi ha potuto chiaramente riconoscere il miglioramento nel processo di produzione. Secondo, l'inizio della manifestazione dei segni clinici di ED ha gravemente destabilizzato il progresso nella produzione per circa 4 anni fino alla decisione dell'allevatore di seguire un rigoroso ed efficace protocollo di prevenzione per l'ED. Questa seconda osservazione può riflettere l'assenza di un utile strumento in campo per monitorare, rivedere e migliorare cambiamenti nel processo o procedure di cura con rivalutazioni iterative del miglioramento della qualità nel tempo. I grafici SPC possono rappresentare l'evoluzione di un più vecchio strumento di miglioramento della

qualità come gli audit clinici, che sono largamente descritti in medicina umana e a volte utilizzati in procedure veterinarie sugli animali da compagnia, ma poco riportati in ambito zootecnico. La limitazione degli audit clinici è che in medicina umana questi si basano tipicamente sul confronto della pratica corrente o dei risultati ottenuti con dei "*gold standards*" ben definiti e basati sull'evidenza. In medicina veterinaria, l'assenza di standards basati sull'evidenza scientifica in diverse aree comporta che gli audit clinici possano essere condotti solamente per confrontare la pratica con un consensus o uno standard "*opinion based*" o possono essere utilizzati per creare standard o valori che consentano alle pratiche individuali di confrontarsi con processi o risultati di altre pratiche.

Inoltre il carico di lavoro, la durata e la complessità dell'acquisizione dei casi e il follow up sono costantemente segnalati come un ostacolo agli audit clinici, soprattutto quando applicati in medicina veterinaria. I grafici SPC potrebbero risolvere alcuni dei principali limiti degli audit clinici, uno o pochi parametri chiave di base (parametri iceberg) possono essere selezionati e sfruttati per monitorare il processo produttivo dell'allevamento nel tempo rispetto ai suoi dati del passato. Ad esempio, la mortalità come parametro chiave è già stata utilizzata da altri autori per presentare strumenti di controllo statistico per il monitoraggio dinamico della produzione di suini.

I grafici SPC retrospettivi possono essere più difficili da ottenere a causa della necessità di una raccolta di dati di alta qualità svolta in passato che potrebbe causare l'impossibilità di indirizzare ogni singolo segnale di variazione per causa speciale nel passato (così come nel presente studio) ma l'analisi prospettica può essere facilmente pianificata. In pratica, la singola azienda che adotta un monitoraggio in tempo reale del suo processo produttivo può essere in grado di riconoscere precocemente i segnali fuori controllo ma anche di calcolare un nuovo PCL e i limiti quando il grafico segnala un cambiamento prolungato attraverso i test (e.g. test 2 e 3), riflettendo un nuovo livello di performance.

Dal momento che i grafici sono impostati con un limite di controllo superiore e inferiore, è possibile non solo ottenere un segnale quando il processo devia verso una direzione sfavorevole, ma anche mandare un segnale positivo quando il processo svolta nella direzione desiderata, come dopo i lotti 47-49 nel presente studio. Questo permette all'allevamento di monitorare i suoi risultati e spostare i propri limiti anche quando il metodo viene introdotto per la prima volta in un periodo che non può essere definito sotto controllo, a differenza del Periodo 1 disponibile nel presente studio. Nel caso specifico dello shift positivo per i lotti 47-49, purtroppo dal lotto 52 è apparso un nuovo improvviso aumento della mortalità che mostra ancora una volta un processo fuori controllo. Infatti, il punto fuori controllo può presentarsi senza un previo allarme o segnale di avvertimento. Nell'impiego dei grafici SPC in tempo reale considerando che ogni punto fuori controllo suggerisce che un problema impatta sul processo, è importante identificare il problema e affrontarlo. Di solito, i segnali per i quali non può essere trovata una spiegazione non dovrebbero essere considerati come una scarsa performance da parte del modello, ma piuttosto questi potrebbero denotare un problema non ben individuato dall'allevatore.

L'applicazione di uno strumento di monitoraggio SPC nel singolo allevamento potrebbe incontrare totalmente la nuova frontiera del management degli allevamenti. Infatti, recentemente è emerso il concetto di Zootecnia di precisione (*Precision Livestock Farming, PLF*): un approccio olistico che somma informazioni e tecnologie di comunicazione per migliorare il professo di allevamento. Il PLF gioca un ruolo importante nella rivoluzione industriale dell'allevamento, in quanto usa informazioni e tecnologie di comunicazione per ridurre i costi di investimento e aumentare sia la produzione che la salute animale. Per migliorare l'efficienza, la produttività, la nutrizione degli animali e la salute animale è essenziale gestire in modo corretto i dati ottenuti ogni giorno in allevamento. La tecnologia negli anni ha facilitato lo svolgimento delle tradizionali attività agricole. Specificamente, nella produzione zootecnica

è ora possibile elaborare dati relativi al controllo degli animali raccolti giornalmente e l'SPC potrebbe essere uno strumento adeguato a tale scopo.
In conclusione, l'applicazione retrospettiva di grafici SPC nel presente studio è stata in grado di confermare l'efficacia di un protocollo di prevenzione per l'ED nel ridurre la mortalità come parametro produttivo iceberg in un sito per lo svezzamento dei suinetti. Si suggerisce la creazione di grafici SPC come strumento utile su campo oltre che per la ricerca per fornire informazioni utili sulle relazioni fra decisioni sulla salute, gestione e benessere e alcuni parametri iceberg selezionati negli animali da allevamento. Considerando l'imminente avvento della PLF, si suggerisce un'applicazione prospettica dei grafici SPC per il monitoraggio della singola azienda.

BIBLIOGRAFIA

1. Scollo, A., Fasso, M., Nebbia, P., Mazzoni, C., Cossettini, C. (2022). Managing Shiga toxin-producing E. Coli using statistical process control charts for routine health and production monitoring in pig farming. Frontiers in Veterinary Science, 277.

GLI EFFETTI DELL'ALLEVAMENTO DEL SUINO A CODA LUNGA SU LARGA SCALA: UN *CROSS-SECTIONAL STUDY* ITALIANO AL MACELLO

EFFECTS OF THE LARGE ADOPTION ON UNDOCKED TAILS IN THE SWINE INDUSTRY: AN ITALIAN CROSS-SECTIONAL STUDY AT SLAUGHTER

SCOLLO A.[1*], RUSINÀ A.[1], CAVAZZONI A.[2], CONTIERO B.[3], GOTTARDO F.[3]

[1]*Department of Veterinary Sciences, University of Torino, 10095 Grugliasco, Torino, Italy;*
[2]*Swivet Research sas, 42123 Reggio Emilia, Italy;*
[3]*Department MAPS, University of Padova, 35020 Legnaro, Padova, Italy*

Parole chiave: Taglio coda; macello; suino; cross sectional study
Keywords*:* *Tail docking; slaughter; pig; cross sectional study*

RIASSUNTO
La normativa in vigore prevede che il taglio della coda non costituisca un'operazione di routine. Essendo il fenomeno della morsicatura della coda molto spesso imprevedibile dato che la sua espressione è condizionata da diversi fattori, l'allevamento di animali a coda lunga può aumentare il rischio di insorgenza di lesioni alla coda. Scopo del presente lavoro è stato verificare gli effetti del taglio della coda su larga scala in uno dei maggiori macelli italiani, investigandone eventuali correlazioni con lesioni ai visceri, alla carcassa ed al prosciutto. La presenza di lesioni della coda è stata registrata solo in animali con coda non tagliata (44,0 vs 0% rispetto agli animali con coda tagliata, P<0,001), con una prevalenza di lesioni croniche gravi del 27,3%. Le lesioni polmonari gravi sono state riscontrate più frequentemente negli animali con coda non tagliata (9,2 vs 6,6%, P=0,006), così come le ulcere gastriche (26,1 vs 20,3%, P=0,006). I risultati sembrano suggerire che c'è ancora molto lavoro da fare per ridurre non solo il fenomeno della morsicatura della coda, più evidente nelle partite di animali a coda lunga, ma anche altri problemi sanitari associati a questa problematica comportamentale.

ABSTRACT
The legislation in force provides that tail docking is not a routine operation. Since the phenomenon of tail biting is very often unpredictable given that its expression is conditioned by various factors, fattening pigs with intact tails can increase the risk of injury to the tail. Since tail biting is very often unpredictable given that its expression is conditioned by various factors, fattening pigs with intact tails can increase the risk of injured tails. The aim of this work was to verify the effects of tail docking on a large scale in one of the major Italian slaughterhouses, investigating any correlations with injuries of the viscera, carcass and ham. The presence of tail lesions was recorded only in animals with undocked tails (44.0 vs 0% compared to animals with docked tail, P <0.001), with a prevalence of severe chronic lesions of 27.3%. Severe lung lesions were found more frequently in undocked animals (9.2 vs 6.6%, P = 0.006), as well gastric ulcers (26.1 vs 20.3%, P = 0.006). The results seem to suggest that there is still a lot of work to be done to reduce the phenomenon of tail biting, which is more evident in batches of long-tailed animals.

INTRODUZIONE

Tutte le pratiche effettuate negli allevamenti di suini che determinano dolore come il taglio della coda, la castrazione o la limatura dei denti, sono oggetto di pesanti critiche da parte dell'opinione pubblica. Questa attenzione è anche legata a numerose campagne di sensibilizzazione attuate da associazioni di protezione animale che si sono intensificate in particolare negli ultimi anni. Le mutilazioni zootecniche sono effettuate negli allevamenti principalmente per risolvere problemi gestionali ma possono indurre dolore e/o sofferenza e comportano anche una modificazione del corpo e, talvolta dell'espressione comportamentale dell'animale. L'Unione Europea, anche per rispondere alle istanze dei cittadini, ha sempre posto grande attenzione al benessere animale e nello specifico al tema delle mutilazioni. Questa attenzione si è resa manifesta con la produzione di normativa specifica, di pareri tecnici elaborati dall'Agenzia Europea per la Sicurezza alimentare (EFSA) e pronunciamenti della Commissione Europea (Raccomandazione 2016/336).

La normativa relativa alla protezione degli animali in allevamento (D.LGS. 146/2001, attuazione della direttiva 98/58/CE) e quella riferita nello specifico ai suini (direttiva 2008/120/CE, recepita con D. lgs. 7 luglio 2011) prevedono che il taglio della coda come pure la riduzione degli incisivi dei lattonzoli non devono costituire operazioni di routine, ma devono essere praticati soltanto ove sia comprovata la presenza di ferite ai capezzoli delle scrofe, alle orecchie o alle code di altri suini. È previsto inoltre che prima di effettuare tali operazioni si debbano adottare, a scopo di prevenzione, misure intese ad evitare le morsicature delle code e altri comportamenti anormali tenendo conto delle condizioni ambientali e della densità degli animali (Raccomandazione UE 2016/336 della commissione dell'8 marzo 2016). Il taglio della coda è utilizzato infatti per prevenire un disturbo comportamentale, ma non agisce sulle cause che lo determinano in sistemi di allevamento intensivo.

La piena applicazione di questa normativa in riferimento al taglio della coda complica notevolmente le pratiche di allevamento, essendo il fenomeno della morsicatura della coda molto spesso imprevedibile dato che la sua espressione è condizionata da diversi fattori, alcuni intrinseci all'animale (età, sesso, razza), altri di carattere ambientale (microclima e qualità dell'aria nella stalla) altri ancora più gestionali (densità, modalità di alimentazione, piano alimentare). In questo contesto anche una minima variazione nel management degli animali può portare ad una esplosione di fenomeni di morsicatura difficilmente controllabili, soprattutto tra il terzo ed il quarto mese di vita del suino.

L'attenzione quindi degli allevatori, dei veterinari, dell'assistenza tecnica è indirizzata ad individuare anche sulla base delle risultanze della ricerca, procedure da seguire per l'intero ciclo di allevamento atte a prevenire la morsicatura anche nei suini con coda non tagliata.

Un osservatorio privilegiato per verificare come stanno andando le cose negli allevamenti da quando non si effettua più in modo sistematico il taglio della coda è sicuramente il macello, dove è possibile controllare con continuità un elevato numero di suini registrando non solo le lesioni della coda ma anche quelle che interessano altre parti del corpo e incrociare questi dati con quelli relativi alla valutazione degli organi interni (fegato, polmone, stomaco) e di qualità delle cosce, per valutare se le lesioni alla code sono una conseguenza anche di altri problemi sanitati che si verificano in allevamento oppure se le morsicature ne sono fattore predisponente.

La morsicatura della coda, infatti, è certamente un problema di benessere animale, ma ha anche ricadute di tipo economico riconducibili alle performance di crescita e di qualità della carcassa. Nel caso dell'allevamento del suino pesante se il problema interessa la

coscia la questione è ancora più rilevante per il valore commerciale che questa riveste.
Sulla base di questi presupposti, lo studio ha avuto come obiettivo il monitoraggio al macello delle lesioni alla coda in partite di suini con coda tagliata rispetto a partite di animali a coda non tagliata. In aggiunta a questo, nelle stesse partite sono state valutati anche polmoni, pleura e lesioni gastriche per studiarne eventuali associazioni con il fattore taglio della coda. Inoltre, è stata effettuata una valutazione delle lesioni esterne della carcassa per poter stimare in modo indiretto l'eventuale cambiamento dei fenomeni di aggressività negli animali a coda lunga o a coda tagliata sia in allevamento (lesioni croniche ossia visibili ma in parte rimarginate) come pure durante le fasi di movimentazione e trasporto (lesioni con sangue fresco). La presenza di coda integra o tagliata è stata poi rapportata anche agli eventuali difetti del prosciutto rilevati in sede di rifilatura.

MATERIALI E METODI

Raccolta Dati

I dati sono stati raccolti presso il macello O.P.A.S. Coop di Carpi (MO) per un periodo di 9 mesi (gennaio – settembre 2020). Con visite bisettimanali sono state valutate 525 partite di suini delle quali 83 con suini a coda non tagliata (15,8%). Le partite provenivano da 208 allevamenti e per ciascun allevamento sono state valutate in media 2,6 partite. Tre veterinari esperti valutatori, posizionati in diversi punti della catena di macellazione, hanno applicato una check- list basata su un sistema a punteggi per registrare presenza e gravità delle lesioni a livello della coda, delle orecchie e della cute (riconducibili a fenomeni morsicatura) e a livello dei polmoni, del fegato e dello stomaco.
La velocità della linea di macellazione era di 480 animali all'ora e l'ispezione è stata eseguita direttamente durante il processo di macellazione. I suini sono stati selezionati nella parte centrale del lotto, scartando quelli all'inizio e alla fine di ogni lotto per evitare qualsiasi rischio di inclusione accidentale di suini appartenenti al lotto precedente o successivo. L'identificazione di ogni lotto è stata garantita dalla lettura di codici tatuati sulle cosce nel caso di suini pesanti del circuito delle DOP e dalle marche auricolari o dei tatuaggi per maiali da macelleria.

Valutazione della corata (Polmoni, Pleura, Fegato)

L'ispezione della corata è stata eseguita direttamente durante il processo di macellazione da una piattaforma posta subito dopo l'area di eviscerazione. L'esame di polmoni, pleura e fegato è stato eseguito mediante ispezione visiva e palpazione manuale degli organi, senza effettuare alcuna incisione. La scala di valutazione per l'assegnazione dei punteggi è riportata nella Tabella 1 (Scollo et al., 2017).

Valutazione lesioni della carcassa

L'ispezione delle carcasse è stata eseguita direttamente durante il processo di macellazione da una posizione designata sulla linea dopo la scottatura e prima della depilazione della carcassa, ancora integra al momento della valutazione.
Per assegnare un punteggio alle lesioni la carcassa è stata suddivisa in 3 parti: parte anteriore del corpo, tronco e parte posteriore. Per la valutazione è stata utilizzata una scala a 3 punti per ciascuna delle parti in cui è stata suddivisa la carcassa: punteggio 0 fino a un graffio o un morso, punteggio 1 da due a cinque graffi o morsi, punteggio 2 più di cinque graffi o morsi o qualsiasi ferita che penetri nel muscolo.
È inoltre stata valutata la presenza di lesioni su orecchie e coda, tra cui tagli, necrosi, morsi e cicatrici. Le lesioni alla coda sono state classificate come acute se in presenza

di sangue, e croniche in assenza di sangue. Le lesioni (sia croniche che acute) sono state registrate come lievi o gravi a seconda dell'estensione del danno (Bottacini et al., 2018).

Ulcere Gastriche

Ogni stomaco è stato aperto, circa 10 minuti dopo il dissanguamento, lungo la grande curvatura da una macchina che ha rimosso anche la maggior parte del contenuto gastrico con un getto d'acqua a temperatura ambiente. Il tempo a disposizione per l'assegnazione del punteggio, determinato dalla velocità della macchina, è stato di circa 7-10 secondi.
Le ulcere gastroesofagee sono state classificate utilizzando il metodo proposto da Robertson et al. (2002) che fornisce una scala di 4 valori dove: 0=sano, 1=ipercheratosi, 2=erosione e/o ulcera lieve, 3=ulcera grave.

Difetti della coscia

Alle rilevazioni di carattere più veterinario sono state associate le valutazioni degli esperti del macello sui difetti osservati sulle cosce (prosciutti) delle stesse partite valutate precedentemente in catena di macellazione per le lesioni cutanee e alle code. Le cosce sono state valutate seguendo gli standards PQI (Parma Quality Institute) e i difetti registrati hanno riguardato le venature, le cotenne rosse, la grassinatura, i segni di PSE, lo spessore del grasso di copertura, nonché traumatismi come l'anchetta rotta, gli ematomi, i segni di morsicatura, e gli strappi. Tutti i difetti considerati sono causa di esclusione del prosciutto dal mercato DOP. Nel caso di più di un difetto sullo stesso prosciutto solamente quello che ha causato la percentuale più alta di rifilatura o che ha interessato l'intera coscia è stato considerato, così che nel dataset una coscia di prosciutto corrispondeva ad un solo difetto. La tracciabilità delle cosce è stata garantita dalla corrispondenza dei numeri di identificazione del lotto e della coscia (tatuati in azienda o etichettati durante il processo di macellazione).

RISULTATI

La frequenza dei lotti con la coda non tagliata è stata del 15,8%. La presenza di lesioni della coda è stata registrata solo in animali con coda non tagliata (44,0 vs 0% rispetto agli animali con coda tagliata, P<0,001), con una prevalenza di lesioni croniche gravi del 27,3%.
La prevalenza delle lesioni alla coda osservate nelle carcasse dei 525 lotti è riportata in Tabella 2 è espressa come percentuale media di lesioni alla coda e alle orecchie in relazione al fatto che la coda sia tagliata o meno; e in Tabella 3 espressa come percentuale media di lesioni rilevate in diverse parti della carcassa (parte anteriore, tronco, parte posteriore).
Le lesioni polmonari gravi sono state riscontrate più frequentemente negli animali con coda non tagliata (9,2 vs 6,6%, P=0,006), così come le ulcere gastriche (26,1 vs 20,3%, P=0,006). Nessuna differenza è stata rilevata per la pleura.
La prevalenza delle lesioni su polmoni, fegato e presenza di ulcere gastriche è riportata come percentuale media di lesioni rilevate per i diversi organi in relazione al taglio della coda (Tabella 4).

DISCUSSIONE

L'analisi dei dati raccolti in questo studio evidenzia in primo luogo come il problema delle lesioni alla coda riguardi esclusivamente le partite di suini con coda lunga (non tagliata), interessando in media il 44% dei capi controllati con questa caratteristica (tabella 2). Tra questi animali, il 27,3 % presenta lesioni gravi e croniche e pertanto riconducibili ad

una fase di allevamento non recente. Studi effettuati in Italia sul suino pesante avevano già evidenziato che la fase più critica per la manifestazione di fenomeni di morsicatura riguardassero soprattutto la fascia di età compresa tra il terzo e il quarto mese di vita del suino. Questo, tuttavia, non esclude la possibilità che eventi di morsicatura si possano presentare anche in prossimità della macellazione quando i suini vengono esposti a degli eventi stressanti collegati alla movimentazione, al trasporto o ad un certo grado di rimescolamento. L'ipotesi è confermata dalla presenza anche di lesioni recenti di una certa rilevanza, da moderate a gravi (tabella 2). Per contro, nelle partite di suini con coda tagliata si osserva una maggiore percentuale di soggetti con segni di morsicatura alle orecchie (9,6 contro il 4,6%). Questo è un risultato atteso, perché è noto dalla letteratura scientifica un effetto di sostituzione, ossia la ricerca di un ulteriore punto debole (coda e orecchie sono le parti più facili da colpire) sul quale esercitare dapprima il "gioco" e poi l'aggressività.

Per quanto riguarda invece le lesioni presenti sulle altre parti del corpo (tronco, parte anteriore e posteriore) non si sono osservate differenze significative in termini di percentuale di animali colpiti tra partite di suini a coda intera o tagliata, a conferma del fatto che sono principalmente coda e orecchie i siti più interessati alla morsicatura.

Se prendiamo in esame le lesioni degli organi interni (polmone, fegato e stomaco) si osserva nelle partite dei suini a coda lunga una maggiore frequenza di lesioni gravi al polmone (tabella 4) misurabile anche con un punteggio medio per partita controllata più elevato. Il fenomeno è verosimilmente associato proprio alla presenza, nelle partite di animali a coda lunga, di maggiore frequenza di lesioni alla coda, sebbene non si possa escludere l'inverso, ovvero che le patologie respiratorie ne siano state fattore predisponente. In caso di morsicatura, una delle conseguenze più note in allevamento come in bibliografia è l'infezione che si instaura non solo a livello locale, ma anche a livello sistemico. Infatti, la lesione alla coda non è altro che una porta di accesso di patogeni dall'esterno verso l'organismo; talvolta, se l'infezione raggiunge il circolo sanguigno, può arrivare anche in distretti molto lontani dalla coda e dalla sua lesione. In particolare, gli organi più colpiti sono quelli maggiormente irrorati di sangue o con un flusso maggiore, in primis il polmone. Purtroppo, un dato mancante della presente ricerca, è la rilevazione di ascessi lungo la colonna vertebrale, anch'essi strettamente correlati con una infezione ascendente partita dalla coda.

Controverso invece sembra il risultato ottenuto dall'osservazione dei fegati, che sembrano presentare meno lesioni negli animali a coda lunga rispetto a quelli a coda tagliata. Tuttavia, va sottolineato che le lesioni riscontrate sono di tipo parassitario, e non infettivo. Le aziende che decidono di interrompere il taglio della coda fanno più spesso parte di filiere nelle quali è richiesta una maggiore attenzione manageriale a diversi aspetti, tra cui anche quella della prevenzione delle parassitosi. Dunque, se da un lato l'aumento delle lesioni alla coda in queste filiere è espressione di una difficoltà gestionale che richiede ancora degli sforzi per trovare un equilibrio, dall'altro la riduzione delle lesioni al fegato conferma

Lesioni	Scala	Descrizione
Polmoni Punteggio polmoni (Madec Score)	0-24	Lesioni polmonari (polmonite enzootica-like, spesso causata da *Mycoplasma hypopneumoniae*: consolidamento elastico, consistenza aumentata e marcato edema) sono state valutate in base alla griglia di Madec (Madec and Derrien, 1981). Ogni lobo, ad eccezione di quello accessorio, ha ricevuto un punteggio da 0 a 4 per assegnare un punteggio totale massimo di 24.
Assenza di lesioni	0-1	Polmoni nei quali tutti i lobi, ad eccezione di quello accessorio, hanno ricevuto score 0.
Lesioni gravi	0-1	Polmoni con un Madec score ≥5/24
Cicatrici	0-1	Presenza di lesioni polmonite enzootica-like guarite, con connettivo interlobulare ispessito dal viola al grigio (dipende dall'età) che appare come tessuto retratto.
Ascessi	0-1	Presenza di almeno un ascesso nei polmoni.
Consolidazioni	0-1	Lesioni polmonari complicate da batteri patogeni secondari (e.g. Pasteurella spp, Bordetella spp), lesioni più compatte e dense delle lesioni polmonite enzootica-like. In caso di superficie tagliata, la lesione era macchiaya da cluster ramificati di alveoli distesi da un essudato dal grigio al bianco e l'essudato mucopurulento poteva essere spremuto dalle vie aeree (VanALstine, 2012).
Lesioni con pattern lobulare/a scacchiera	0-1	Presenza di punti disseminati multifocali di colorazione da viola a grigia indicativi di una probabile coesistenza di virus (Virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino, Corcovirus suino, Virus dell'influenza) e/o Mycoplasma spp o corpi estranei (e.g polvere/particolato) (Leneveu et al.,2016)
Pleura Punteggio pleura (SPES score)	0-4	Griglia SPES (Dottori et al.,2007). 0: Assenza di lesioni pleuriche; 1: pleurite cranioventrale e/o aderenze fra i lobi o a livello di margine ventrale dei lobi; 2: pleurite focale dorsocaudale unilaterale; 3: Pleurite bilaterale di tipo 2 o pleurite unilaterale estesa (almeno 1/3 di un lobo diaframmatico); 4: Grave pleurite bilaterale estesa (almeno 1/3 di entrambi i lobi diaframmatici). Eziologia più probabile: *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Haemophilus parasuis*, Pesteurella spp, Bordetella spp, *Mycoplasma Hyorhinis.*
Lesioni gravi	0-1	Pleura con SPES score ≥3.
Sequestri	0-1	Presenza di almeno un sequestro nei polmoni (acuto: aree consistenti,elastiche e chiazzate da rosso scuro a bianco chiaro con abbondante fibrina e parenchima necrotico ed emorragico; o cronico: risoluzione di aree non necrotiche da infezioni acute risultanti in foci necrotici cavitati circondati da tessuto cicatriziale). Spesso associata a infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Gottschalk, 2012).
Fegato Punteggio fegato	1-3	Punteggio basato sul numero di lesioni *milk spot* causate dalla presenza e migrazione di *Ascaris suum*. 1: nessuna lesione o meno di 4 lesioni; 2: Da 4 a 10 lesioni; 3: Più di 10 lesioni.
Lesioni gravi	0-1	Fegato con punteggio 3
Lesioni totali	0-1	Fegato con punteggio ≥ 2

Tabella 1: Scala di valutazione usata per la valutazione delle lesioni di pleura, fegato e polmoni al macello da gennaio a settembre 2020. Sono stati monitorati 525 lotti di suini (135 suini per lotto, intorno a 170 kg di peso).

Table 1: *Scoring scale used for the evaluation of pleura, liver, and lungs lesions at slaughter from January to September 2020. A total of 525 batches of heavy pigs were monitored (135 pigs per batch, around 170 kg of body weigth).*

	coda tagliata	coda lunga	Significatività statistica
Nessuna lesione	100,0	56,0	0,000
Lesione moderata e recente	0,0	8,8	0,000
Lesione moderata e cronica	0,0	0,9	0,000
Lesione grave e recente	0,0	7,2	0,000
Lesione grave e cronica	0,0	27,3	0,000
Presenza di lesioni alle orecchie	9,6	4,6	0,001

Tabella 2: Percentuale media di code con lesioni in relazione al taglio della coda.
***Table 2**: Percentage of tail lesions in docked and undocked pigs.*

	coda tagliata	coda lunga	Significatività statistica
Parte Anteriore del corpo			
assenza di lesioni	80,1	74,8	Ns
lesione lieve	15,4	18,9	Ns
lesione grave	4,5	6,4	Ns
Tronco			
assenza di lesioni	85,3	82,0	Ns
lesione lieve	12,2	12,3	Ns
lesione grave	3,2	4,8	Ns
Parte Posteriore del corpo			
assenza di lesioni	77,5	75,5	Ns
lesione lieve	18,1	20,2	Ns
lesione grave	3,2	3,6	Ns

Tabella 3: Percentuale media di lesioni osservate in diverse parti della carcassa (anteriore, tronco, posteriore) in relazione in relazione al taglio della coda
***Table 3**: Percentage of skin lesions on the different areas of the carcass in docked and undocked pigs*

	coda tagliata	coda lunga	Significatività statistica
Lesioni del polmone:			
nessuna lesione	59,4	54,4	0,017
presenza di lesioni gravi	6,6	9,2	0,006
Punteggio medio	1,12	1,44	0,001
Lesioni del fegato:			
lesioni gravi	5,4	4,1	0,021
lesioni complessive	17,8	14,2	0,004
Punteggio medio	1,23	1,18	0,005
Ulcere dello stomaco:			
Presenza di ulcere da lievi a gravi	20,3	26,1	0,006
Punteggio medio	1,13	1,22	0,030

Tabella 4: Percentuale e punteggi medi di lesioni rilevate in polmoni, fegati e stomaci in relazione al taglio della coda.
***Table 4**: Percentage and average scores of the pluck lesions in docked and undocked pigs.*

questa maggiore attenzione che, nel caso delle parassitosi del fegato, è un risultato facilmente ottenuto tramite interventi antiparassitari. Le ulcere gastriche sono un problema diffuso nei suini e la loro presenza dipende da molteplici fattori prevalentemente collegati all'alimentazione (granulometria dei mangimi, tipo di cereali, modalità di somministrazione della dieta). Tuttavia, è nota la connessione tra le ulcere gastriche ed il livello di stress nell'uomo così come negli animali. Probabilmente, la maggiore frequenza di lesioni medio-gravi negli animali a coda lunga è espressione di una condizione di stress direttamente collegata al fenomeno di morsicatura della coda rilevato tramite le lesioni, che determina nelle partite di animali colpiti anche una condizione di stress psico-somatico.

Dall'analisi dei dati è invece emerso che non sembrano esserci differenze tra partite con coda tagliata rispetto a quelle con coda per quanto riguarda i difetti dei prosciutti.

Per concludere, il monitoraggio effettuato al macello ha prodotto informazioni utili sulla situazione in allevamento e sulle caratteristiche delle carcasse di suini allevati con coda non tagliata. Se da un lato la buona notizia è che l'eventuale morsicatura della coda non provoca problematiche gravi nella coscia, purtroppo i risultati sembrano indicare che c'è ancora molto lavoro da fare per ridurre il fenomeno della morsicatura della coda, più evidente nelle partite di animali a coda lunga. Per le aziende con manifeste problematiche di morsicatura sarà quindi necessario continuare a lavorare ancora su numeri limitati di suini con coda lunga per consentire al personale di allevamento di consolidare una maggiore esperienza nella gestione di questa tipologia di animali.

BIBLIOGRAFIA

1. 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(11), e0207115.
2. 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.
3. Gottschalk, M., 2012. Actinobacillosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwarts, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), Diseases of Swine. , Tenth edn. John Wiley & Sons Gottschalk Inc., pp. 653–669.
4. Leneveu, P., Pommier, P., Pagot, E., Morvan, H., Lewandowski, E., 2016. Slaughterhouse Evaluation of Respiratory Tract Lesions in Pigs. RoudennGrafik − Guingamp/Plérin Edn (p110).
5. Madec, F., Derrien, H., 1981. Fréquence, intensité et localization des lesions pulmonaires chez le porc charcutier: résultats d'une première série d'observations en abattoir. Journées de la Recherche Porcine en France 13, 231–236.
6. Merialdi, G., Dottori, M., Bonilauri, P., Luppi, A., Gozio, S., Pozzi, P., Spaggiari, B., Martelli, P., 2012. Survey of pleuritis and pulmonary lesions in pigs at abattoir with a focus on the extent of the condition and herd risk factors. Vet. J. 193, 234–239.
7. Robertson ID, Accioly JM, Moore KM, Driesen SJ, Pethick DW and Hampson DJ 2002. Risk factors for gastric ulcers in Australian pigs at slaughter. Preventive Veterinary Medicine 53, 293–303.
8. Scollo, A., Gottardo, F., Contiero, B., Mazzoni, C., Leneveu, P., & Edwards, S. A. (2017). Benchmarking of pluck lesions at slaughter as a health monitoring tool for pigs slaughtered at 170 kg (heavy pigs). Preventive veterinary medicine, 144, 20-28.
9. VanAlstine, W.G., 2012. Respiratory system. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwarts, K.J., Stevenson, G.W. (Eds.), Diseases of Swine., tenth edn. John Wiley & Sons, Inc., pp. 348–362.

CARENZA DI RIBOFLAVINA IN DUE AZIENDE BIOLOGICHE ITALIANE

RIBOFLAVIN DEFICIENCY IN TWO ITALIAN ORGANIC FARMS

TORREGGIANI C.[1], FRANCHI L.[2], BORRI E.[2], PROSPERI A.[1], LUPPI A.[1]

[1]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER);*
[2]*Progeo, Italia;*

Parole chiave: natimortalità, riboflavina, allevamento biologico
Keywords: Stillbirth, riboflavin, organic farming

RIASSUNTO
Il caso clinico descritto nel presente studio ha interessato due allevamenti biologici, rispettivamente di 250 scrofe (allevamento A) e 320 scrofe (allevamento B) rispettivamente. Verso la fine dell'anno 2019 e inizio del 2020, in entrambe gli allevamenti, è stata rilevata una elevata incidenza di parti anticipati e nascita di suinetti disvitali o nati morti in assenza di segni clinici nelle scrofe. Negli ultimi mesi del 2019, attraverso la somministrazione di progestinici (110-111-112) la situazione ha mostrato un miglioramento ma nel corso del 2020 si è rilevato un ulteriore peggioramento che nell'ottobre del 2020 ha portato a registrare livelli di mortalità intra-nidiata dal 60% al 100%. In entrambe gli allevamenti la problematica è perdurata per tutto il 2020 portando rispettivamente alla perdita di 970 (allevamento A) e 1600 (allevamento B) suinetti. Esami di laboratorio condotti su campioni biologici prelevati in corso di esami necroscopici su suinetti, alimento e acqua di abbeverata, non hanno fornito risultati significativi. In letteratura alcuni studi riportano un importante ruolo della vitamina B2 sull'efficienza riproduttiva della scrofa. Nel presente caso, nonostante la carenza di riboflavina non sia stata dimostrata analiticamente, le manifestazioni cliniche, la quantità di riboflavina presente nell'alimento e l'efficacia dell'integrazione nella dieta di vitamina B2 hanno portato ad una diagnosi *ex juvantibus* di carenza da riboflavina.

ABSTRACT
The clinical case in the current study affected two organic farms, composed of 250 sows (Farm A) 320 sows (Farm B) respectively. In both farms, towards the end of the year 2019 and the beginning of 2020, a high incidence of premature birth or stillborn piglets occurred. However, sows did not show clinical signs. In the last months of 2019, the administration of progestogens (110-111-112), showed an apparent initial improving, but this was not effective to solve the problem which persisted throughout 2020, reaching, during October 2020, an intra-litter mortality ranging from 60% to 100%. In both farms the problem led to the loss of 970 (farm A) and 1600 (farm B) piglets. Laboratory tests conducted on piglets, feed and water samples did not lead to significant results. There are scarce reports and information on the effects of riboflavin deficiency in pregnant sows, however some studies report an important role of vitamin B2 on the reproductive efficiency of the sow. Even though Riboflavin deficiency was not demonstrated analytically, the clinical presentation, the amount of vitamin B2 in feed and the effectiveness of riboflavin integration led to an *ex juvantibus* diagnosis of deficiency condition.

INTRODUZIONE
La mortalità neonatale dei suinetti costituisce un grave problema nelle produzioni suinicole ed è caratterizzata da eziologia multifattoriale che colpisce sia l'economia aziendale sia il benessere

animale. Questa è associata a fattori di rischio infettivi e non-infettivi. Tra i fattori di rischio non infettivi si possono annoverare fattori genetici, materni, ambientali e fattori legati all'ospite (Vanderhaegeet al., 2013). Altrettanto rilevanti fattori di rischio sono il peso e le dimensioni dei suinetti alla nascita, nonchè l'alimentazione materna che impatta direttamente sullo sviluppo fetale (Rangstrup-Christensen et al., 2017; Threadgoldet al. 2021).
L'utilizzo di integratori nutrizionali durante la gestazione è una strategia utile per migliorare il benessere e la sopravvivenza dei suinetti alla nascita (Threadgold et al., 2021). Tra questi, la riboflavina è considerata indispensabile per le funzioni riproduttive. Nelle scrofe gravide, infatti, la carenza di riboflavina può portare a parti prematuri, natimortalità e mortalità nei primi giorni dopo la nascita (Frank et al., 1988).
Secondo alcuni autori, solo alcuni alimenti offrono un apporto sufficiente di riboflavina in grado di soddisfare le necessità nutrizionali dei suinetti. A tale proposito, bisogna ricordare che la dieta tipica dei suini, basata largamente sull'uso di cereali, ha spesso livelli di riboflavina bassi o borderline. Il ridotto aumento ponderale e l'indice di conversione dell'alimento sono segni di carenza di riboflavina in tutte le specie colpite (McDowell et al., 2000).
Il presente lavoro si pone come obiettivo quello di descrivere un caso clinico che ha interessato due allevamenti biologici che presentavano parti prematuri nelle scrofe, natimortalità e la nascita di suinetti disvitali e sottolineare come la carenza di riboflavina nella dieta, durante la fase di gestazione, sia un fattore da tenere in considerazione in caso di natimortalità o parti prematuri.

DESCRIZIONE DEL CASO

Il caso clinico descritto nel presente studio ha interessato due allevamenti biologici, rispettivamente di 250 (allevamento A) e 320 scrofe (allevamento B). Nei due allevamenti, appartenenti allo stesso proprietario, veniva somministrato agli animali lo stesso mangime biologico. I due allevamenti presentavano status stabile per PRRSV, gestito in banda tri-settimanale e genetica Topig 20 e 60 con verro terminale Topig Fomeva11. Le due aziende avevano una produzione interna di scrofette GGP e GP. L'inseminazione seguiva il programma Topig.
Gli animali erano ubicati in recinto da parto (7,5X2 m) con scrofa libera, pavimento solido e presenza di paglia con temperatura del box parto di 21-22°C, mentre nel "nido" questa era mantenuta a 26-27°C.
Nell'allevamento A da marzo 2020 è comparsa una elevata incidenza di parti anticipati (3-4 giorni prima della data prevista del parto) nel 48% dei parti. Questo è stato osservato sistematicamente nei lotti successivi (il 30-40% delle scrofe ha mostrato un parto precoce). Ad agosto/settembre 2020, il 35,8% delle scrofe ha mostrato parto anticipato e il 20% delle scrofe secondipare ha manifestato nuovamente il problema. Le scrofe non presentavano segni clinici di rilievo così come non venivano osservati aborti o problemi di fertilità.
Nell'Allevamento B il problema è iniziato nell'ottobre 2019 quando alcune scrofe primipare hanno presentato parto prematuro (3-4 giorni prima della data prevista del parto), con nascita di suinetti disvitali o nati morti. La somministrazione di progestinici (110-111-112), da novembre a fine dicembre 2019, ha mostrato un significativo miglioramento. Una volta sospesa la somministrazione di progestinici, la situazione ha mostrato un'apparente normalizzazione e si sono fermati i casi di parto prematuro e di natimortalità. Nel corso del 2020 la situazione ha subito un nuovo peggioramento con parti prematuri delle scrofe ed elevata mortalità dei suinetti 15-24 ore dopo la nascita. Nel settembre 2020, i parti prematuri hanno interessato anche le scrofe di secondo e quarto parto, ma non le primipare. Nel mese successivo la mortalità intra-nidiata, coinvolgente 13 nidiate (numero di suinetti per nidiata da 15 a 22-23 suinetti) variava dal 60 al 100%.
In entrambe gli allevamenti la problematica è perdurata per tutto il 2020 portando rispettivamente alla perdita di 970 (allevamento A) e 1600 (allevamento B) suinetti.

Indagini di laboratorio

Duecentotre suinetti nati morti o disvitali e deceduti poco dopo la nascita sono stati conferiti presso la sezione diagnostica dell'IZSLER di Parma e sottoposti ad esame necroscopico. Attraverso i dati anamnestici a disposizione e sulla base dei rilievi anatomopatologici 7 di questi erano nati morti ed i restanti erano morti poche ore dopo la nascita. All'esame necroscopico non si osservavano lesioni macroscopiche di rilievo a carico dei diversi organi e apparati. In sede necroscopica sono stati prelevati campioni da sottoporre ad indagini diagnostiche (**Tabella 1**).

L'esame colturale ha dato esito negativo per tutti i campioni analizzati così come le indagini condotte per la ricerca di PRRSV, PPV, PCV2, Enterovirus, SuHV-1, EMCV, APPV, *Chlamydia* spp., *Leptospira* spp., *Toxoplasma gondii*. Cinque su 13 pool di visceri sono risultati positivi per Sapelovirus. Tuttavia, bisogna ricordare che, secondo alcuni autori, Sapelovirus è stato associato a molte patologie che interessano principalmente l'apparato gastrointestinale, neurologico e riproduttivo, ma anche infezioni subcliniche; tuttavia, per la maggior parte dei sierotipi non è stato dimostrato un ruolo nel determinare forme cliniche (Stäubli et al., 2021). Campioni di Cervello, cervelletto, rene, milza, fegato, polmone, cuore e intestino sono stati prelevati per l'esame istopatologico e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, successivamente sezionati al microtomo e colorati con ematossilina-eosina. L'esame istopatologico non ha mostrato alterazioni significative, non confermando il ruolo di Sapelovirus nel determinismo della problematica.

Gli esami di laboratorio condotti sull'alimento ed acqua di abbeverata non hanno mostrato risultati significativi. Il mangime somministrato alle scrofe è stato sottoposto ad indagini per evidenziare la presenza di Zearalenone ed altre micotossine, che hanno sempre evidenziato livelli assenti o non significativi. L'acqua di abbeverata proveniente dai pozzi aziendali è stata sottoposta ad indagini chimico-fisiche e microbiologiche senza presentare alterazioni significative.

Tabella 1. Esami di laboratorio effettuati e risultati
Table 1. *Laboratory exams and results*

Esame di laboratorio	Metodo	Risultati
Esame colturale	Semina su Agar globuli e Gassner incubato a 37 °C per 48 ore	Negativo
PRRSV PCR Real Time	*Virotype* PRRS RT-PCR Kit (Kit Indical)	Negativo
PCV2 PCR Real Time	Olvera et al., 2004	Negativo
EMCV PCR	(Bakkali Kassimi et al., 2002)	Negativo
Enterovirus (Sapelovirus) PCR	La Rosa et al., 2006	Positivi campioni di 5 pool/13 pool analizzati
PPV	Kim et al., 2001	Negativo
Chlamydia spp.	Ehricht et al., 2006	Negativo
APPV PCR	Schwarz et al., 2017	Negativo
SuHV-1	Yoon et al., 2005	Negativo
Leptospira spp.	Bediret al. , 2010	Negativo
Toxoplasma gondii	Menotti et al., 2010	Negativo
Istologia	Valutazione istomorfologica dei tessuti colorati con ematossilina-eosina, in seguito a fissazione in formalina al 10%	Non rilevate lesioni significative

La valutazione della composizione del mangime ha mostrato un livello di Riboflavina di 1,25 mg/kg di dieta, rivelando una possibile carenza di Riboflavina (Vit. B2). Il livello dietetico di riboflavina attualmente raccomandato (NRC, 2012) per i suini in gestazione, infatti, è di 3,75 mg/kg di dieta (7,87 mg/giorno). Sulla base di questo sospetto l'integrazione di riboflavina attraverso somministrazione intramuscolare (per 3 giorni, 30 giorni prima del parto) e orale (per i successivi 30 giorni fino al parto) di 10 ml/scrofa di complesso vitaminico (3 mg/ml di riboflavina) nelle scrofe gestanti ha eliminato completamente il problema.

DISCUSSIONE

La riboflavina gioca un ruolo essenziale nel rilascio di energia e nell'assimilazione di nutrienti; pertanto, la sua carenza può portare all'instaurarsi di diverse problematiche sanitarie caratterizzate da un'ampia varietà di sintomi. È importante sottolineare che gli animali non sono in grado di sintetizzare la riboflavina, perciò è necessario che questa venga introdotta attraverso la dieta. In letteratura (Cunha et al., 1977) sono riportati alcuni effetti della carenza da riboflavina, tra i quali, i sintomi nei suinetti in accrescimento comprendono anoressia, ritardo nella crescita, dermatiti, alopecia, difficoltà alla deambulazione, colite ulcerosa, infiammazione della mucosa anale, vomito, cataratta, fotofobia, opacità del cristallino, edema gelatinoso diffuso dei tessuti connettivi.

Nella grave carenza di riboflavina dei suini, i ricercatori hanno osservato neutrofilia, una diminuzione della risposta immunitaria, epatosi, e mielina degenerata dei nervi sciatico e brachiale (NRC, 1998).

In stati carenziali da riboflavina la riproduzione è compromessa, alcuni autori, tra cui Cunha et al., nel 1977, hanno elencato alcuni sintomi clinici che le scrofe possono presentare durante le fasi riproduttive e durante la lattazione se alimentate con una dieta carente di riboflavina. Questi sintomi prevedono perdita di appetito, scarso incremento ponderale, parto anticipato da 4 fino a 16 giorni, mortalità fetale, natimortalità e mortalità nelle prime ore successive al parto (entro 48 ore).

I suinetti nati morti possono presentare ipotricosi ed edema gelatinoso alle parti declivi (arti) o generalizzato. Ensminger et al. (1947) hanno riportato che la carenza di riboflavina è responsabile di parti prematuri, nascita di suinetti nati morti e mortalità neonatale.

Maggiore è la lunghezza del periodo in cui le scrofe vengono alimentate con alimenti poveri di riboflavina nella dieta, maggiore è la gravità delle manifestazioni cliniche. Inoltre, anche la dimensione dei suinetti può essere un fattore di rischio che può contribuire all'evoluzione del problema così come quella della nidiata. L'aumento delle dimensioni della nidiata è un fattore di rischio per la natimortalità (Rangstrup-Christensen et al., 2017). Una nidiata composta da un numero di suinetti >12 ha un rischio maggiore di presentare fenomeni di natimortalità (Cecchinato et al., 2008). Nel caso presentato, come riportato, si trattava di animali iperprolifici (numero di suinetti per nidiata da 15 a 22-23 suinetti) e questo può aver aggravato il quadro determinato dalla carenza di riboflavina.

Il fabbisogno di riboflavina può variare con le caratteristiche ambientali, l'età, l'attività fisica, il benessere, fattori ereditari e componenti dell'alimento stesso. Alcuni autori indicano che la necessità di riboflavina diminuisce con la maturità dell'animale mentre aumenta nelle fasi riproduttive (McDowell et al., 2008).

Le diete normalmente somministrate ai suini, basate in gran parte sull'impiego di cereali sarebbero spesso carenti di riboflavina. Un ridotto tasso di crescita e una minore efficienza alimentare sono quadri frequentemente osservabili in caso di carenza di riboflavina in tutte le specie animali colpite. È stata dimostrata una ridotta assunzione di mangime nelle scrofette a cui è stata somministrata una dieta per l'allattamento contenente 1,3 mg/kg di riboflavina. Queste scrofette consumavano il 30% in meno di mangime rispetto a quelle che ricevevano

diete con riboflavina da 2,3 a 5,3 mg/kg (Frank et al., 1988).
Bazer e Zavy (1988) hanno riferito che l'integrazione con 100 mg di riboflavina al giorno, forniti dal quarto al decimo giorno dopo l'inizio dell'estro, hanno determinato una maggiore dimensione della nidiata, sopravvivenza embrionale al giorno 30 di gestazione nelle scrofette e un aumento dei tassi di concepimento e più suini vivi alla nascita, al giorno 21 e 42 di lattazione nelle scrofe primipare. Pettigrew et al. (1996) hanno fornito nell'alimento 10 (controllo), 60, 110 o 160 mg di riboflavina al giorno, per 21 giorni dopo l'inseminazione. Sebbene l'integrazione con riboflavina tendesse ad aumentare la percentuale di scrofe al parto (66,7%, 85,7%, 93,3% e 86,7% rispettivamente per 10, 60, 110 e 160 mg di riboflavina al giorno), non è stato rilevato alcun effetto sulla dimensione della nidiata.
In questo caso clinico, nonostante la carenza di riboflavina non sia stata dimostrata dal punto di vista analitico, la manifestazione dei sintomi clinici, la quantità di vitamina B2 nell'alimento così come l'efficacia dell'integrazione di riboflavina nell'alimento hanno portato a una diagnosi *ex juvantibus* di condizione carenziale da riboflavina.
In questo studio si è voluto descrivere un caso clinico che ha interessato due allevamenti biologici che presentavano parti prematuri nelle scrofe, natimortalità e la nascita di suinetti disvitali e sottolineare che la carenza di riboflavina nella dieta durante la fase di gestazione è un fattore da tenere in considerazione in caso di natimortalità o parti prematuri.

BIBLIOGRAFIA

1. Bakkali Kassimi L., Gonzague M., Boutrouille A., Cruciere C. (2002) "Detection of Encephalomyocarditis virus in clinical samples by immunomagnetic separation and on-estep RT-PCR", Journal of Virological Methods 101, p. 197–206.
2. Bazer, F. W., and Zavy, M. T.(1988) J. Anim. Sci. 66(Suppl. 1), 324
3. Bedir O., Kilic A., Atabek E., Kuskucu A.M., Turhan V., Basustaoglu A.C. (2010) "Simultaneous detection and differentiation of pathogenic and nonpathogenic Leptospira spp. by multiplex real-time PCR (TaqMan) assay", Pol J Microbiol 59: 167-73.
4. Cecchinato A., Bonfatti V., Gallo L. and Carnier P. (2008) "Survival analysis of pre-weaning piglet survival in a dry-cured hamproducing crossbred line", Journal of Animal Science 86, p. 2486-2495. http://dx.doi.org/10.2527/jas.2007-0825
5. Cunha, T. J. (1977) "Swine Feeding and Nutrition", Academic Press, New York
6. Ehricht R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. (2006) "Optimized DNA micro-array assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies", Mol Cell Probes.;20(1):60-3. doi: 10.1016/j.mcp.2005.09.003. Epub 2005 Dec 5. PMID: 16330186.
7. Esminger M.E., Bowland J.P., Cunha T.J.(November 1947) "Observations on the Thiamine, Riboflavin, and Choline Needs of Sows for Reproduction", Journal of Animal Science, Volume 6, Issue 4, p. 409–423
8. Frank, G. R., Bahr, J. M., and Easter, R. A.(1984) J. Anim. Sci. 59, 1567.
9. Frank G. R., Bahr J. M., Easter R. A.(1988) "Riboflavin Requirement of Lactating Swine", Journal of Animal Science, Volume 66, Issue 1, Gennaio, p.47–52
10. Hoffmann B., Beer M., Schelp C., Schirrmeier H., Depner K.(2005) "Validation of a real-time RT-PCR assay for sensitive and specific detection of classical swine fever", J Virol Methods, 130(1-2):36-44. doi: 10.1016/j.jviromet.2005.05.030
11. Hughes, S. G., (1984) J. Nutr. 114, 1660
12. Kim J., Choi C., Han d.U., Chae C.(2001) "Simultaneous detection of porcine circovirus type 2 and porcine parvovirus in pigs with PMWS by Multiplex PCR", The Veterinary Record, 149, p. 304-305
13. La Rosa G, Muscillo M, Di Grazia A, Fontana S, Iaconelli M, Tollis M. (2006)

"Validation of rt-PCR assays for molecular characterization of porcine teschoviruses and enteroviruses", J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health., 53(6):257-65. doi: 10.1111/j.1439-0450.2006.00955.x. PMID: 16907956.
14. Menotti J., Y. J et al.(2005) "Evaluation of a new 5'-nuclease real-time PCR Real-Time targeting the Toxoplasma gondii AF146527 genomic repeat", Clin Microbiol Infect; 16: 363–368
15. McDowell L.R. (2008) "Riboflavin", In Vitamins in animal and human nutrition, Iowa State University Press, Ames, IA, USA , pp. 311-346
16. NRC (1998) "Nutrient Requirements of Swine", Nutrient Requirements of Domestic Animals. National Academy of Sciences-National Research Council, Washington, D.C, 10th Ed.
17. NRC (2012) " Nutrient Requirements of Swine", 11th ed. National Academic Press, Washington. D.C., USA.
18. Olvera A, Sibila M, Calsamiglia M, Segalés J, Domingo M (2004) "Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a Real Time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally affected pigs", J Virol Methods. 117:75-80
19. Pettigrew J. E., Yang H. (1997) "Protein nutrition of gestating sows", *Journal of Animal Science*, Volume 75, Issue 10, Ottobre, p. 2723–2730
20. Rangstrup-Christensen L., Krogh M. A., Pedersen L. J., Sørensen J. T. (2018) "Sow level risk factors for early piglet mortality and crushing in organic outdoor production", Animal, 12:4, p. 810–818
21. Rangstrup-Christensen L., Krogh M. A., Pedersen L. J., Sørensen J. T. (2017) "Sow level risk factors for stillbirth of piglets in organic sow herds", Animal, 11:6, p. 1078-1083
22. Schwarz L., Riedel C., Högler S., Sinn L.J., Voglmayr T., Wöchtl B., Dinhopl N., Rebel-Bauder B., Weissenböck H., Ladinig A., et al.(2017) "Congenital infection with atypical porcine pestivirus (APPV) is associated with disease and viral persistence", *Vet. Res.*; 48:1. doi: 10.1186/s13567-016-0406-1.
23. Stäubli T., Rickli C., Torgerson P.R., Fraefel C., Lechmann J. (2021) "Porcine teschovirus, sapelovirus, and enterovirus in Swiss pigs: multiplex RT-PCR investigation of viral frequencies and disease association", Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Vol.33 (5), p. 864-874
24. Threadgold, T., Greenwood, E.C., Van Wettere, W. (2021) "Identifying Suitable Supplements to Improve Piglet Survival during Farrowing and Lactation", Animals, 11, 2912. https://doi.org/ 10.3390/ani1110291
25. Vanderhaege C, Dewulf J., de Kruif A., Maes. D. (2013) "Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: A review", Animal Reproduction Science 139, p. 76–88
26. Yoon HA1, Eo SK, Aleyas AG, Park SO, Lee JH, Chae JS, Cho JG, Song HJ. (2005) "Molecular survey of latent pseudorabies virus infection in nervous tissues of slaughtered pigs by nested and real-time PCR." J Microbiol., 43 (5):430-6

INDAGINI *IN SITU* SULLA PATOLOGIA INTESTINALE DEL SUINO: RISULTATI PRELIMINARI DA UN PERCORSO DIAGNOSTICO PER *LAWSONIA INTRACELLULARIS*

IN SITU INVESTIGATION ON SWINE ENTERIC PATHOLOGY: PRELIMINAR DATA FROM A DIAGNOSTIC PATHWAY FOR LAWSONIA INTRACELLULARIS

D'ANNUNZIO G.[1, 3], OSTANELLO F.[1], JACUMIN N.[2], LEOTTI G.[2], TOMMASINI N.[2], ALBORALI G. L.[3], TONNI M.[3], FORMENTI N.[3], LUPPI A.[3], VIO D.[4], CAPUCCHIO M.T.[5], PEROTTI M.[5], ZOPPI S.[6], GIORGIUTTI M.[7], MANDRIOLI L.[1], SARLI G.[1]

[1] *Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna*
[2] *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna*
[3]*Boehringer Ingelheim Animal Health Italia SpA*
[4]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie*
[5]*Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli studi di Torino*
[6]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta*
[7]*Veterinario libero professionista Friuli Venezia Giulia*

Parole chiave: *Lawsonia intracellularis,* PCV2, immunoistochimica
Keywords: *Lawsonia intracellularis*, PCV2, immunohistochemistry

RIASSUNTO
Le patologie enteriche del suino sono caratterizzate da infezioni multiple che provocano modelli clinici complessi in cui non è facile oggettivare l'eziologia. L'istologia può contribuire alla diagnosi co-localizzando l'agente eziologico all'interno delle lesioni che produce. Nell'ambito della valutazione preliminare di un percorso diagnostico per *Lawsonia intracellularis* (LI), sono stati esaminati 3 tipologie di campioni: a) casi clinici di malattia, b) campioni prelevati in azienda da soggetti con sindrome enterica e c) campioni prelevati al macello in caso di sospetto di presenza di forme subcliniche. Il percorso diagnostico ha previsto uno screening iniziale con PCR qualitativa per LI per selezionare i casi da sottoporre a conferma mediante istologia (evidenza di iperplasia delle cripte dell'ileo) ed IHC (presenza di LI). L'accordo osservato fra i risultati dei 2 metodi **è risultat**o del 70,0%; si è confermato il percorso diagnostico in 2/2 casi clinici, 6/17 casi con sindrome enterica suggestiva di enteropatia proliferativa (PE), 4/11 casi con sospetto di forma subclinica campionati al macello, tutti risultati preliminarmente positivi alla PCR. Sui campioni è stata condotta anche l'indagine immunoistochimica (IHC) per PCV2 che ha permesso di evidenziare deplezione linfocitaria nelle placche del Peyer e da moderata a lieve positività per PCV2 rispettivamente in 1/2 casi clinici e in 2/17 casi con sindrome enterica. È plausibile che forme gravi di patologia enterica possano essere correlate all'azione di patogeni in grado di impattare gravemente sulla funzionalità del sistema immunitario condizionando la patogenicità degli altri agenti in gioco. Risulta fondamentale l'applicazione di protocolli diagnostici *ad hoc* che conducano ad una diagnosi conclusiva permettendo l'impiego di misure di controllo e profilassi mirate.

ABSTRACT
Swine enteric diseases are characterized by multiple infections which are responsible for complex pattern of disease, and often it is not easy to objectify the etiology. Histopathology can aid in diagnosis by allowing co-localization of the causative agent within the lesions it produces. The preliminary results of a diagnostic pathway for *Lawsonia intracellularis* (LI) infection

are presented. Caseload is from 3 contexts: 1) clinical cases of disease, 2) enteric disease with sampling on the farm or 3) sampling at the slaughterhouse in case of suspicion of subclinical forms. Immunohistochemical investigation (IHC) to PCV2 was also made. The diagnostic pathway involves an initial screening with qualitative PCR for LI to select those cases to be confirmed by histology (evidence of ileum's crypts hyperplasia) and IHC (presence of LI). The observed agreement between the 2 methods was 70,0%; diagnosis was confirmed in 2/2 clinical cases, 6/17 cases with enteric disease and 4/11 cases selected at the slaughterhouse that were preliminarily positive on PCR. The parallel investigation to PCV2 was able to highlight lymphocyte depletion in Peyers patches and moderate to mild positivity to PCV2 in 1/2 clinical cases and 2/17 cases with enteric disease, respectively. It is plausible that the action of pathogens capable of seriously impacting the functionality of the immune system might be responsible for more serious forms of disease, increasing the pathogenicity of the other agents involved. The application of ad hoc diagnostic protocols is essential to make a conclusive diagnosis that allows the implementation of targeted control and prophylaxis measures.

INTRODUZIONE

Le patologie enteriche rappresentano uno dei più importanti problemi nell'allevamento intensivo del suino, non solo in termini di perdite produttive ed economiche, ma anche perché direttamente correlate con il benessere animale e l'uso di antimicrobici. In allevamento le patologie enteriche sono spesso caratterizzate da infezioni multiple che, provocando modelli clinici di malattia complessi, rendono difficile l'identificazione e l'implementazione di misure di controllo efficaci [1].
Nel post-svezzamento, gli agenti responsabili di forme diarroiche possono essere patogeni batterici, quali ceppi enterotossigeni di *E. coli* (ETEC), oppure, come nel caso della malattia degli edemi, ceppi di *E. coli* produttori di tossina Shiga (STEC). A questi si aggiungono, già nelle prime settimane di vita, patogeni virali e parassitari come rotavirus, cryptosporidi e coccidi. Nelle fasi di magronaggio ed ingrasso le patologie più importanti sono la salmonellosi, la dissenteria suina da *Brachyspira hyodysenteriae*, le spirochetosi da *Brachyspira* spp., l'enteropatia proliferativa (PE) da *Lawsonia intracellularis* e ascaridiosi [1].
Anche il circovirus suino tipo 2 (PCV2) è associato a forme enteriche: la diarrea è uno dei possibili segni descritti nelle *Porcine Circovirus Associated Diseases* (PCVDs), sia in caso di forme sistemiche di malattia da PCV2, che nella forma clinica intestinale definita PCV2-*enteric disease* – PCV2-ED [2,3].
La comparsa di PCV2 e delle patologie ad esso associate nella prima decade del ventunesimo secolo, ha cambiato drasticamente i pattern di malattia nell'allevamento suinicolo, mostrando il potenziale patogeno di agenti endemici come effetto diretto dell'azione immunosoppressiva del PCV2 [1].
La compromissione delle difese immunitarie innate e adattative, che caratterizza l'infezione da PCV2 [4], si manifesta nell'ileo con alterazioni dell'immunità mucosale intestinale quali: variazioni nell'espressione di geni immuno-correlati, variazioni nell'assetto immunitario cellulare locale e nella produzione di IgA [5]. Il risultato è un potenziale dismicrobismo nonché la possibilità che si realizzino co-infezioni, tra cui quelle più comunemente riportate sono rappresentate da co-infezioni tra PCV2 e *Salmonella* spp., *Brachyspira* spp., e/o *L. intracellularis* [6–9].
Le infezioni da *L. intracellularis* o da PCV2 sono entrambe associate a ritardo della crescita, deperimento, aumento della mortalità e diarrea nei suini svezzati, e sono caratterizzate da lesioni talvolta indistinguibili macroscopicamente, quali ileite e colite necrotizzante. Di conseguenza, soprattutto nelle co-infezioni, l'istopatologia e lo studio delle lesioni microscopiche sono uno strumento fondamentale per confermare il ruolo come reale patogeno (co-localizzazione agente-lesione) delle molteplici *noxae* biologiche coinvolte nei quadri di malattia [7].
L'associazione tra PCV2 e *L. intracellularis* nell'eziologia di quadri enterici nel suino è nota sia nella patologia spontanea [7] che in quella sperimentale [9].

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare, mediante indagine istologica ed immunoistochimica, l'infezione e/o la co-infezione tra PCV2 e *L. intracellularis* su campioni di ileo di suini conferiti per sospetta enteropatia proliferativa da *L. intracellularis*.

MATERIALI E METODI

I campioni di tessuto esaminati in questo studio, e su cui sono state svolte le indagini istopatologiche ed immunoistochimiche, fanno parte di una casistica raccolta con la finalità di definire la fattibilità di un percorso diagnostico per enterite da *L. intracellularis* nel suino. Il percorso diagnostico comprende l'integrazione dei reperti istopatologici con i risultati degli esami biomolecolari qualitativi (PCR/RT-PCR) per *L. intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae e B. pilosicoli* su pool di feci e su campioni di tessuto eseguiti dai laboratori degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali delle Venezie (IZSVe) e della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER). Sulla base dell'anamnesi il prelievo dei campioni poteva riguardare soggetti con sospetto di forma clinica di PE, oppure essere applicato in caso di sindromi enteriche in allevamento o in caso di sospetto diagnostico di forme subcliniche con campionamento al macello (per quest'ultima categoria inclusa, è stata eseguita PCR qualitativa per *L. intracellularis* dall' Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta – IZSTO).
La casistica di questo studio preliminare di fattibilità del percorso diagnostico è rappresentata da 30 campioni di ileo di cui 2 provenienti da casi clinici di enteropatia proliferativa emorragica (PHE), 17 campionati in allevamento da suini con sintomatologia diarroica indicativa di infezione da *L.intracellularis* e/o scarso accrescimento e 11 casi con sospetto di forma subclinica campionati al macello.

Istologia e immunoistochimica (IHC)

I campioni di tessuto sono stati fissati in formalina tamponata al 10% e successivamente processati ed inclusi in paraffina. Da ciascun campione di ileo sono state quindi ricavate sezioni di 3 micron di spessore, successivamente colorate con ematossilina eosina per l'allestimento del preparato istologico. In parallelo, altre due sezioni di ciascun campione sono state sottoposte a colorazione immunoistochimica rispettivamente per *L. intracellularis* e PCV2. I dettagli del protocollo immunoistochimico utilizzato, riguardanti inibizione delle perossidasi, smascheramento dei siti antigenici e diluizione d'uso degli anticorpi primari impiegati sono riportati in Tabella 1. La reazione antigene-anticorpo è stata evidenziata utilizzando come cromogeno la diaminobenzidina (0,04% per 2').
Come controlli positivi sono stati impiegati rispettivamente una sezione di ileo precedentemente individuato come positivo per la presenza di *L. intracellularis*, ed una di linfonodo positivo alla prova IHC per PCV2.
In tutte le prove IHC è stata inserita una sezione di ileo di suino utilizzato come controllo negativo impiegando un anticorpo dello stesso isotipo degli anticorpi primari (IgG1) ma di irrilevante specificità.

Tabella 1. Immunoistochimica (IHC), materiali e metodi.
Table 1. Immunohistochemistry (IHC), material and methods.

Ab primario	Tipo, Clone	Ditta	Diluizione/ incubazione	Smascheramento siti antigenici
L. *intracellularis*	*Lawsonia intracellularis* Supernatant of $A_1 8B_1$ [10]	DTU-VET	1:200/ overnight 4°C	-
PCV2	mAb 36A9, Isotipo: IgG_2a Anti-VP2 PCV2	Ingenasa, Madrid, Spain	1:1500/ overnight 4°C	30' in protease XIV 0,05%, pH 7,5, a 37°C

La gravità delle lesioni microscopiche osservate è stata valutata applicando dei sistemi di *grading* secondo quando riportato in letteratura [9]. Ad ogni sezione di ileo è stato assegnato un punteggio per la presenza di infiltrato infiammatorio nella mucosa (0, normale; 1, lieve infiltrato cellulare prevalentemente di tipo linfo-istiocitario; 2, moderato infiltrato con coinvolgimento della sottomucosa; 3, grave infiltrazione cellulare di mucosa e sottomucosa); per l'iperplasia delle cripte intestinali caratteristica dell'infezione da *L. intracellularis* (0, normale; 1, lieve iperplasia delle cripte; 2, moderata iperplasia; 3, grave iperplasia delle cripte con o senza erniazione delle cripte nella sottomucosa) ed infine per la deplezione linfocitaria nelle placche del Peyer, tipica dell'infezione da PCV2 (0, normale; 1, deplezione delle placche del Peyer; 2, deplezione delle placche del Peyer e sostituzione con infiltrato istiocitario; 3, deplezione, sostituzione con infiltrato istiocitario e presenza di cellule multinucleate).
La reazione immunoistochimica per *L. intracellularis* è stata considerata positiva in caso di presenza di materiale granulare di colore bruno nel citoplasma apicale delle cellule delle cripte intestinali e/o nel citoplasma di macrofagi nell'interstizio della mucosa intestinale. Questo segnale, indicante la presenza dell'antigene di *L. intracellularis,* è stato valutato tramite *grading* semiquantitativo attribuendo un punteggio da 0 a 3 (0, assenza di segnale; 1, segnale focale; 2, segnale multifocale di moderata entità; 3, segnale esteso) sulla base della gravità e dell'estensione della positività per *L. intracellularis* [7,11]. Per PCV2, la prova è stata valutata positiva in caso di colorazione marrone del citoplasma di cellule dendritiche centro-follicolari nelle placche del Peyer e/o di macrofagi nella lamina propria della mucosa, applicando un punteggio da 0 a 3 (0, negativo; 1, cellule con colorazione dell'antigene PCV2 in meno del 10% dei follicoli linfoidi; 2, cellule con colorazione dell'antigene PCV2 nel 10-50% dei follicoli linfoidi; 3, cellule con colorazione positiva per l'antigene PCV2 in più del 50% dei follicoli linfoidi) [9,12].

Batteriologia e indagini biomolecolari

La casistica ha origini eterogenee che riflettono la diversità di approccio diagnostico intrapreso. Per gli 11 campioni prelevati al macello erano disponibili solo i risultati della PCR qualitativa per *L. intracellularis*. Gli altri casi sono stati sottoposti ad esami collaterali batteriologici per i principali *E. coli* patogeni del suino e/o biomolecolari aggiuntivi. Oltre alla PCR su pool di feci e su campioni di intestino per *L. intracellularis, Brachyspira hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* e (solo per i campioni provenienti dall'IZSVe) per rotavirus, i polmoni di alcuni animali (9/19) sono stati esaminati per la ricerca di PRRSV e PCV2 con PCR quantitativa.

RISULTATI

I risultati del *grading* delle lesioni istologiche e delle prove immunoistochimiche per *L. intracellularis* e PCV2 sono riportati in Tabella 2, da cui si evince, in tutti i casi esaminati, un obiettivo quadro di grave enterite (valore mediano dell'infiltrato infiammatorio pari a 3 su una scala 0-3), con un grado elevato di iperplasia delle cripte (anche per questo parametro valore mediano pari a 3 su una scala 0-3), associati ad una moderata deplezione linfocitaria del tessuto linfoide (valore mediano 2 su una scala 0-3).
Analizzando separatamente i risultati in funzione della tipologia di campione (caso clinico, campioni da soggetti provenienti da azienda con sintomatologia enterica, campioni dal macello), la positività immunoistochimica per *L. intracellularis* è stata dimostrata in entrambi i due campioni di ileo conferiti con indicazione di caso clinico di enteropatia proliferativa emorragica (Figura 1). In questi casi, all'esame microscopico la mucosa dell'ileo appariva gravemente infiltrata da numerosi linfociti, plasmacellule ed istiociti frammisti ad eritrociti stravasati (emorragia) ed ispessita per la moderata/grave iperplasia delle cripte intestinali, con multifocale erniazione delle stesse nella sottomucosa (Figura 2). In uno dei due casi di

enteropatia proliferativa emorragica è stata evidenziata deplezione linfocitaria e sostituzione con cellule istiocitarie nelle placche del Peyer. Questo stesso caso è risultato positivo anche per la colorazione dell'antigene PCV2, rivelato con IHC multifocalmente in più del 10% dei follicoli linfoidi e nei macrofagi nella lamina propria (Figura 3).

Tabella 2. Risultati del *grading* delle lesioni istologiche e delle prove immunoistochimiche per *L. intracellularis* e PCV2.
C, caso clinico; A, caso campionato in allevamento; M, caso campionato al macello; IHC, immunoistochimica; -, non determinabile.

Table 2. *Scoring of histological lesions and immunohistochemical results for L. intracellularis and PCV2.*
C, clinical case; A, sampling on the farm; M, sampling at the slaughterhouse; IHC, immunohistochemistry; -, not evaluable.

Score clinico	num. campione	Grading			IHC per	
		infiltrato infiammatorio	iperplasia delle cripte	deplezione linfoide	*L. intracellularis*	PCV2
C	AP20427	3	3	2	1	2
C	AP24700	3	2	-	3	0
A	AP21360	3	3	1	1	0
A	AP23254	3	3	0	2	1
A	AP23255	3	3	2	1	1
A	AP23559	3	3	1	1	0
A	AP25007	3	3	1	1	0
A	AP25008	3	3	1	1	0
A	AP20814	0	1	0	0	0
A	AP20815	2	2	0	0	0
A	AP20854	2	1	2	0	0
A	AP20524	3	3	2	0	0
A	AP23560	3	3	2	0	0
A	AP24531	3	2	3	0	0
A	AP24532	3	2	2	0	0
A	AP24771	1	2	2	0	0
A	AP24772	1	1	1	0	0
A	AP25380	3	1	2	0	0
A	AP25453	3	2	2	0	0
M	83/22	3	3	2	0	0
M	84/22	3	2	2	0	0
M	85/22	3	3	1	0	0
M	86/22	3	3	2	0	0
M	87/22	3	3	2	1	0
M	88/22	3	3	1	1	0
M	89/22	3	3	1	1	0
M	90/22	3	3	2	1	0
M	91/22	3	3	2	0	0
M	92/22	3	3	2	0	0
M	93/22	3	3	1	0	0

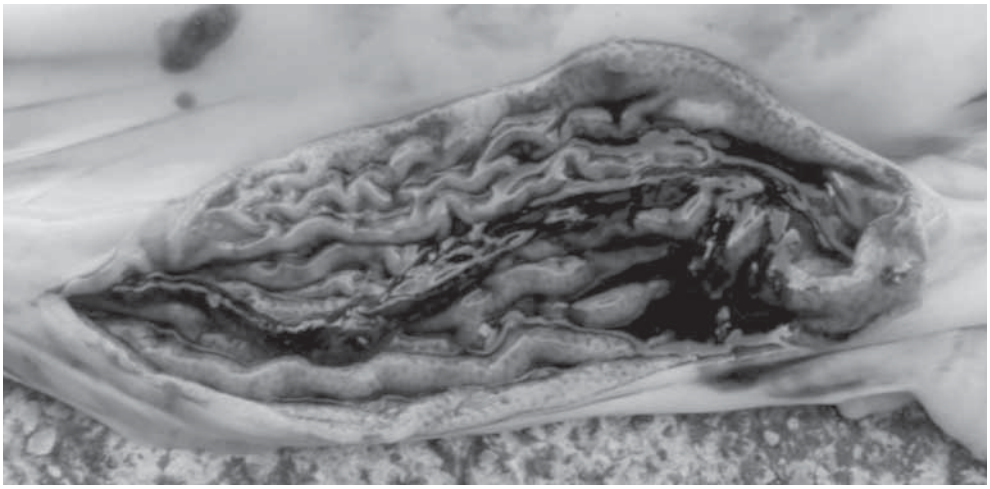


Figura 1. Aspetto macroscopico dell'ileo in uno dei casi clinici di enteropatia proliferativa emorragica (PHE), caratterizzata da ispessimento della mucosa e coaguli di sangue nel lume.
Figure 1*. Gross lesion consistent with clinical case of proliferative hemorrhagic enteropathy (PHE). Grossly, PHE is characterized by mucosal thickening and lumen filled with blood clots.*

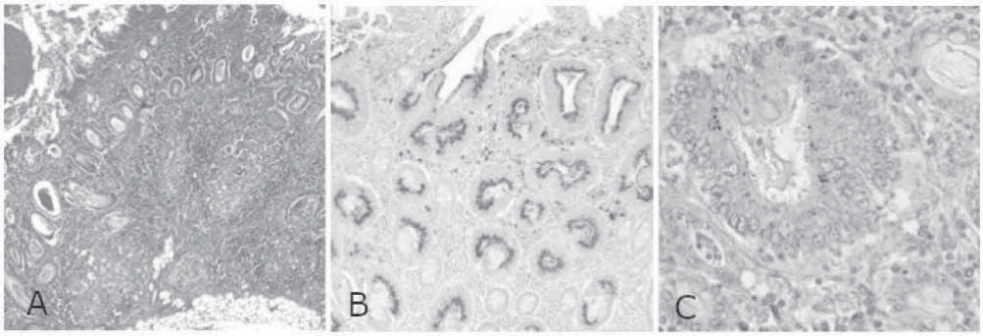


Figura 2. A) iperplasia di grado 3 con erniazione delle cripte intestinali nella sottomucosa; EE, 40x. B) positività di grado 3 per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali; IHC, 100x; C) dettaglio della positività per *L. intracellularis* nel citoplasma delle cellule delle cripte intestinali iperplastiche; IHC, 400x.
EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

Figure 2. A) crypt hyperplasia score 3: marked hyperplasia with crypt herniation in submucosal layer; HE, 40x. B) positive cytoplasmic staining for L. intracellularis within crypt epithelial cells, score 3; IHC, 100x; C) detail of positive cytoplasmic staining for L. intracellularis within hyperplastic epithelial cells of the intestinal crypt; IHC, 400x.
HE, hematoxylin eosin; IHC, immunohistochemistry.

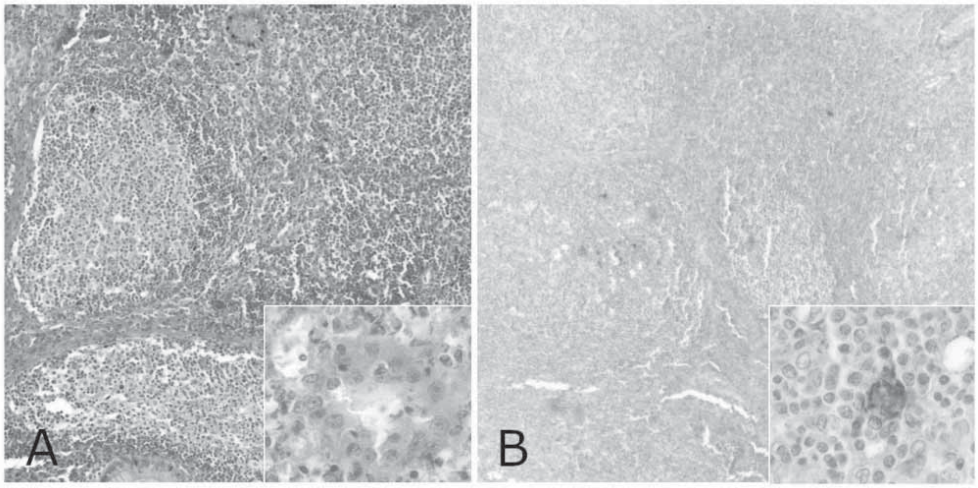


Figura 3. A) Deplezione linfoide di grado 2, con sostituzione del centro dei follicoli da parte di cellule istiocitarie; EE, 100x; inserto: dettaglio della presenza di istiociti al centro dei follicoli. B) positività centrofollicolare per PCV2, grado 2; IHC, 40x; inserto: dettaglio di positività citoplasmatica al PCV2 in una cellula centrofollicolare.
EE, ematossilina eosina; IHC, immunoistochimica.

Figure 3. A) lymphoid depletion score 2: lymphocytes replaced by histocytes in the center of follicles; HE, 100x; insert: detail of histiocytes. B) positive staining forPCV2 antigen in a follicle, score 2; IHC, 40x; insert: detail of positive cytoplasmic staining to PCV2 antigen in a follicular cell.
HE, hematoxylin eosin; IHC, immunohistochemistry.

L'iperplasia delle cripte e il grado di infiltrazione di cellule infiammatorie nella mucosa è risultato essere prevalentemente di grave/moderata entità nei casi con sindrome enterica e/o sospetti di forma subclinica di enteropatia proliferativa. Rispettivamente, sono risultati positivi a *L. intracellularis* 6 dei 17 (35,3%) campioni di ileo prelevati da soggetti provenienti da allevamenti con diarrea e sospetto di forma subclinica di PE, e 4 degli 11 (36,4%) campioni di ileo prelevati al macello; in entrambe le situazioni, il punteggio mediano della positività per *L. intracellularis* è risultato pari a 1.
La valutazione della deplezione linfoide nei casi con anamnesi di infezione subclinica da *L. intracellularis* ha evidenziato un grado di deplezione linfocitaria da lieve/moderata in tutti i casi, e grave deplezione ma presenza di cellule multinucleate solo in un caso. I casi campionati al macello mostravano un grado di deplezione linfoide sempre di grado 1 o 2.
La co-infezione di *L. intracellularis* con PCV2 nei casi con sindrome enterica suggestivi di enteropatia proliferativa è stata dimostrata in due casi, nei quali è stato rivelato, mediante IHC, l'antigene PCV2 al centro dei follicoli linfoidi e multifocalmente nella lamina propria (grado 1).
Dai risultati degli esami batteriologici e biomolecolari, per la maggior parte dei casi è emerso un quadro di positività a più di un agente eziologico virale e/o batterico tra cui: *E. coli* emolitico, *E. coli* enterotossico (ETEC), Rotavirus tipo A, *Clostridium perfringens* tipo A, PCV2, PRRSV.

Confrontando i dati dei risultati dell'IHC con quelli della PCR per *L. intracellularis* la concordanza osservata è risultata del 70,0% (95%CI: 50,6-85,3%) (Tabella 3). In particolare, considerando l'istologia come *gold standard*, dei 21 campioni positivi alla PCR, 12 sono stati confermati all'IHC; 7 dei rimanenti 9 campioni (PCR+/IHC-) sono stati prelevati al macello da animali in cui non vi era una sintomatologia clinica. Nessuno dei campioni positivi all'IHC è risultato negativo alla PCR e tutti i campioni negativi alla PCR lo erano anche all'IHC.

Tabella 3. Accordo osservato dei risultati IHC e PCR
Table 3. Observed agreement of IHC and PCR results

		IHC		
		+	-	
PCR	+	12 (a)	9 (b)	21
	-	0 (c)	9 (d)	9
		12	18	30 (n)

Nota: Accordo osservato= (a)+(d)/n= 12+9/30=70,0%

DISCUSSIONE

Mediante esame istologico, l'iperplasia delle cripte intestinali, lesione caratteristica dell'infezione da *L. intracellularis,* è stata osservata in tutti i casi sospetti di PE. Mediante IHC, la positività per l'antigene è stata dimostrata in 12 delle 30 sezioni di ileo esaminate. Sono risultati positivi all'IHC i 2 campioni provenienti dai 2 casi clinici, 4 degli 11 campioni prelevati al macello e 6 dei 17 campioni provenienti da allevamenti che presentava casi di diarrea e/o sospetto di forma subclinica di PE.

La PE può manifestarsi con forme cliniche diverse, da acute (nella forma di enteropatia proliferativa emorragica, *proliferative hemorrhagic enteropathy* – PHE) a croniche (adenomatosi intestinale o *porcine intestinal adenomatosis* – PIA), fino a forme subcliniche di infezione [13,14], che sono le più frequenti nonché le più subdole da diagnosticare poiché gli unici segni evidenti sono rappresentati da riduzione dell'incremento ponderale medio giornaliero (IPMG), difformità di accrescimento nei gruppi ed aumento dei soggetti di scarto [15].

Il sospetto clinico di PE è avvalorato dall'osservazione, all'esame *post-mortem,* delle lesioni macroscopiche caratteristiche della malattia rappresentate dall'ispessimento e sollevamento in pieghe della mucosa dell'ileo, che assume il cosiddetto aspetto "cerebroide", e a cui si aggiunge, nelle forme acute emorragiche, la presenza nel lume di coaguli di sangue frammisti a materiale fibrino-necrotico [13,14]. Infine, la diagnosi definitiva è condotta mediante tecnica IHC, che rappresenta il test più affidabile per la diagnosi *post-mortem* di PE [16] nonché il *gold standard* diagnostico, potendo mettere in evidenza la presenza dell'antigene di *L. intracellularis* nel contesto delle lesioni tipiche [13].

Nel presente studio il sospetto clinico di forma acuta di PHE è stato confermato, mediante IHC e PCR, in entrambi i casi conferiti con anamnesi di diarrea emorragica.

Al macello, l'osservazione dell'ispessimento della mucosa dell'ileo in alcuni suini può far avanzare il sospetto che gli animali della partita siano stati interessati da patologie intestinali riconducibili all'azione di *L. intracellularis* nel corso del loro ciclo produttivo. Negli animali da noi esaminati, i risultati dell'esame istologico e dell'immunoistochimica hanno confermato la diagnosi di adenomatosi intestinale (PIA) da *L. intracellularis* in 4 degli 11 animali campionati al macello.

Per quanto riguarda i casi con sindrome enterica sospetta PE, 6 dei 17 animali sono risultati positivi per *L. intracellularis* sia in IHC che in PCR, mentre per due suini positivi in PCR la diagnosi non è stata conclusiva (IHC negativa) poiché non è stato possibile evidenziare l'antigene nelle cellule delle cripte intestinali, verosimilmente a causa della quantità di microorganismo inferiore al limite di sensibilità della metodica immunoistochimica.
La PCR ha una maggiore sensibilità rispetto all'IHC e fornisce quindi risultati positivi in una maggiore proporzione di casi, identificando la presenza del genoma di *L. intracellularis* anche quando le quantità di microrganismo sono talmente basse da non essere verosimilmente la causa della patologia osservata. Al contrario, l'IHC fornisce un risultato positivo solo quando la quantità di *L. intracellularis* è rilevante e, quindi, è probabilmente la causa della patologia enterica osservata. Ne consegue che, dal punto di vista della diagnosi causale della patologia enterica osservata, l'esame IHC fornisce risultati più soddisfacenti.
In termini di specificità della diagnosi causale della patologia enterica riconducibile a *L. intracellularis* è quindi vantaggiosa l'esecuzione in serie dei due test: la PCR può essere utilizzata come tecnica di screening per identificare la presenza del microrganismo e, solo in caso di positività, i campioni saranno esaminati con l'istologia e l'immunoistochimica per la conferma definitiva del ruolo rivestito da *L. intracellularis* quale reale agente causale della patologia enterica osservata, valutando la presenza/quantità dell'agente eziologico e la sua localizzazione all'interno delle lesioni (iperplasia delle cripte e/o enterite).
Tutti gli altri casi sospetti subclinici sono risultati negativi per *L. intracellularis* sia in IHC che con l'indagine biomolecolare ma l'esecuzione di indagini diagnostiche collaterali ha sempre potuto rilevare la positività ad uno o più agenti eziologici diversi, tra cui ceppi di *E. coli* (emolitico e/o ETEC) e tra gli agenti virali rotavirus, PRRSV e PCV2. La presenza di PCV2 nelle placche del Peyer dell'ileo è stata evidenziata con IHC in 3 casi di cui uno con grave enterite emorragica da PHE e gli altri 2 con forma enterica di PE, tutti contemporaneamente positivi per *L. intracellularis* nell'epitelio delle cripte. L'indagine PCR ha inoltre individuato la presenza del genoma di PCV2 e/o PRRSV in altri organi (polmoni) di 4 soggetti che presentavano ileo positivo per *L. intracellularis.*
La quasi totalità dei casi esaminati nel presente studio mostravano un certo grado di deplezione linfoide, registrato come di grado moderato/grave (2 / 3) nei casi di co-infezione dimostrata (con IHC o PCR) con PCV2 e/o PRRSV.
Entrambi questi virus sono in grado di interferire a vari livelli con il sistema immunitario e gran parte delle gravi conseguenze sanitarie ed economiche negli allevamenti suinicoli è legato proprio alla loro capacità di modulare le difese dell'ospite e di alterare le capacità di difesa dell'organismo nei confronti di altri agenti patogeni [17].
Il presente studio avvalora l'ipotesi che l'infezione da parte di agenti eziologici che determinano immunosoppressione (es. PCV2 e PRRSV), possa favorire la co-infezione con altri agenti patogeni ubiquitari compresa, come qui dimostrato con tecniche istopatologiche, *L. intracellularis.* Peraltro la segnalazione dell'associazione PCV2 con *L. intracellularis* è già nota in letteratura [7,9].
I risultati ottenuti confermano che la complessità delle relazioni tra diversi patogeni coinvolti possa condizionare la possibilità di giungere ad una diagnosi conclusiva di malattia. In molte situazioni, dove un risultato di PCR qualitativa non sempre può essere associato ad una diagnosi di malattia, lo studio delle lesioni microscopiche con il supporto dell'IHC permette invece di oggettivare il ruolo svolto nel processo patologico in atto da parte di un determinato agente patogeno, qualora sia possibile co-localizzare l'agente nel contesto delle lesioni caratteristiche da esso causate.

CONCLUSIONI

Le malattie enteriche del suino, come quelle respiratorie, sono patologie complesse e spesso caratterizzate dalla contemporanea presenza di uno o più agenti microbici. Come emerso dai risultati di questo studio, spesso è possibile riscontrare la presenza contemporanea di più agenti eziologici, associati a forme cliniche diverse. È plausibile che forme più gravi di patologia intestinale possano essere correlate all'azione di patogeni in grado di impattare gravemente sulla funzionalità del sistema immunitario condizionando la patogenicità degli altri agenti in gioco, come ampiamente dimostrato in letteratura per patogeni quali PCV2 e PRRSV. Se da una parte rimane quindi cruciale l'applicazione di piani di profilassi in un'ottica di riduzione dell'uso degl i antimicrobici in azienda, è fondamentale l'applicazione di protocolli diagnostici *ad hoc* che conducano ad una diagnosi conclusiva permettendo l'impiego di misure di controllo e profilassi mirate.

I risultati di questo studio preliminare di fattibilità del percorso diagnostico per enterite proliferativa da *L. intracellularis* ribadiscono l'importanza dell'istopatologia come tecnica diagnostica d'elezione per la diagnosi di PE, e la necessità di impiegarla in affiancamento ad altri esami di laboratorio. Lo studio e l'interpretazione delle lesioni osservate nel processo patologico in atto possono fornire informazioni utili a stabilire il ruolo che i diversi agenti eziologici messi in evidenza hanno nel determinismo di patologie complesse come le enteropatie del suino.

BIBLIOGRAFIA

1. Thomson, J. R. & Friendship, R. M. (2019) "Digestive System" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 234–263.
2. Baró, J., Segalés, J. & Martínez, J. (2015) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) enteric disease: An independent condition or part of the systemic disease?" *Vet Microbiol* 176, 83–87.
3. Segalés, J. (2012) "Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis" *Virus Res* 164, 10–19.
4. Darwich, L. & Mateu, E. (2012) "Immunology of porcine circovirus type 2 (PCV2)" *Virus Res* 164, 61–7.
5. Shi, F., Li, Q., Zou, Z., Wang, Y., Hou, X., Zhang, Y., Song, Q., Zhou, S., & Li, H. (2020) "The changes of immune-related molecules within the ileal mucosa of piglets infected with porcine circovirus type 2" *J Vet Sci* 21, e78.
6. Järveots, T., Saar, T., Põdersoo, D., Rüütel-Boudinot, S., Sütt, S., Tummeleht, L., Suuroja, T., & Lindjärv, R. (2016) "Lawsonia intracellularis and Porcine Circovirus type-2 infection in Estonia" *Pol J Vet Sci* 19, 291–301.
7. Jensen, T. K., Vigre, H. & Svensmark, B. Ã. (2006) "Distinction between Porcine Circovirus Type 2 Enteritis and Porcine Proliferative Enteropathy caused by Lawsonia intracellularis" *J Comp Pathol* 135, 176–182.
8. Takada-Iwao, A., Nakanishi, M., Souma, J., Chikata, S., Okuda, Y., Imai, Y., & Sato, S. (2011) "Porcine circovirus type 2 potentiates morbidity of Salmonella enterica serovar Choleraesuis in Cesarean-derived, colostrum-deprived pigs" *Vet Microbiol* 154, 104–112.
9. Opriessnig, T., Madson, D. M., Roof, M., Layton, S. M., Ramamoorthy, S., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2011) "Experimental Reproduction of Porcine Circovirus Type 2 (PCV2)-Associated Enteritis in Pigs Infected with PCV2 Alone or Concurrently with Lawsonia intracellularis or Salmonella typhimurium" *J Comp Pathol* 145, 261–270.
10. Boesen, H. T., Jensen, T. K., Møller, K., Nielsen, L. H. & Jungersen, G. (2005) "Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of porcine proliferative enteropathy" *Vet Microbiol* 109, 105–12.

11. Johansen, M., Nielsen, M., Dahl, J., Svensmark, B., Bækbo, P., Kristensen, C. S., Hjulsager, C. K., Jensen, T. K., Ståhl, M., Larsen, L. E., & Angen, O. (2013) "Investigation of the association of growth rate in grower-finishing pigs with the quantification of Lawsonia intracellularis and porcine circovirus type 2" *Prev Vet Med* 108, 63–72.
12. Opriessnig, T., Thacker, E. L., Yu, S., Fenaux, M., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2004) "Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2" *Vet Pathol* 41, 624–640.
13. Vannucci F.A., Gebhart C.J., M. S. (2019) "Proliferative enteropathy" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 891–911.
14. Lawson, G. H. K. & Gebhart, C. J. (2000) "Proliferative Enteropathy" *Jf Comp Pathol* 122, 77–100.
15. Karuppannan, A. K. & Opriessnig, T. (2018) "Lawsonia intracellularis : Revisiting the Disease Ecology and Control of This Fastidious Pathogen in Pigs" *Front Vet Sci* 5, 1–11.
16. Campillo, M., Smith, S. H., Gally, D. L. & Opriessnig, T. (2021) "Review of methods for the detection of Lawsonia intracellularis infection in pigs" *J Vet Diagn Invest* 33, 621–631.
17. Chase, C. & Lunney, J. K. (2019) "Immune System" in: *Diseases of Swine*, Wiley, 264–291.

PREMIO
PIERFILIPPO GUADAGNINI 2022

VINCITORE

EPIDEMIOLOGIA DELLE NUOVE SPECIE DI PARVOVIRUS DEL SUINO IN FOCOLAI DI REPRODUCTIVE FAILURE IN ITALIA

EPIDEMIOLOGICAL SURVEY OF NEW PORCINE PARVOVIRUS SPECIES IN REPRODUCTIVE FAILURE OUTBREAKS IN ITALY

FAUSTINI G.[1], TUCCIARONE C.M.[1], DONNESCHI A.[2], FRANZO G.[1], BONIOTTI B.[2], ALBORALI G.L.[2], DRIGO M[1].

[1]*Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute (MAPS) - Università di Padova;*
[2]*Istituto Zooprofilattico Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna, Brescia.*

Parole chiave: Porcine parvovirus, reproductive failure, real-time PCR.
Keywords: Porcine parvoviruses, reproductive failure, real-time PCR.

RIASSUNTO

All'ormai noto Porcine parvovirus 1 (PPV1), dal 2001 si sono affiancate nuove specie di parvovirus suini (PPV2-7), la cui rilevanza è ancora incompresa. Questo studio intende indagarne la presenza in Italia a partire da feti raccolti da focolai di *reproductive failure* e conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) nel biennio 2019-2020. Avvalendosi di quattro distinte duplex real-time PCR, descritte in studi precedenti, PPV1 e tutte le nuove specie PPV2-7 sono state identificati in almeno un'azienda. Il 46,7% e il 57,4% del totale delle aziende testate rispettivamente nel 2019 e nel 2020 sono risultate positive per almeno una specie di PPV, con frequenza decrescente per PPV6-1-3-7-2. Basse percentuali si sono osservate per PPV4 e PPV5.
Analizzando i nostri risultati in relazione alle frequenze dei patogeni ricercati presso l'IZSLER, nel 2020 co-infezioni tra PPV2-7 e agenti virali e batterici si sono osservate rispettivamente nel 22,2% e 11,1% delle aziende testate; l'associazione più comune è risultata fra PCV-2 e almeno una specie di PPV (23,8%). PPV2-7 sono stati rilevati singolarmente nel 17,8% (2019) e 7,4% (2020) delle aziende. Questo studio oltre a fornire un aggiornamento epidemiologico sul PPV1, evidenzia per la prima volta la circolazione delle nuove specie di PPV sul territorio italiano, come singolo agente e in co-infezione con altri patogeni comunemente responsabili di *reproductive failure.*

ABSTRACT

Since 2001, the well-known porcine parvovirus 1 (PPV1) has been flanked by new species of porcine parvovirus (PPV2-7), whose role is still unclear. This study aims to investigate their presence in fetuses collected from reproductive failure outbreaks in Italy and submitted to the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) in the biennium 2019-2020. Four distinct duplex real-time PCRs, described in previous studies, identified PPV1 and all new PPV2-7 species in at least one farm. Positive farms for at least one PPV species accounted for 46.7% and 57.4% of those tested in 2019 and 2020, respectively; the most frequently detected species were in decreasing order PPV6-1-3-7-2. Small percentages were observed for PPV4 and PPV5. In relation to the frequencies of other pathogens routinely screened by IZSLER, in 2020 PPV2-7 co-infections with viral and bacterial agents were observed in 22.2% and 11.1% of the farms, respectively. The most common association was between PCV-2 and at least one PPV species (23.8%). New PPVs were detected alone in 17.8% and 7.4% of the farms in 2019 and 2020, respectively. This study provides both an epidemiological update on the presence of PPV1 and the first

evidence of the circulation of new PPV species in Italy, alone or in co-infection with other pathogens commonly responsible for *reproductive failure*.

INTRODUZIONE

Nell'industria suinicola, le malattie infettive rappresentano una costante minaccia per la salute degli animali e per l'economia dell'intero settore. La loro sorveglianza, comprensione, gestione e prevenzione, a partire dal comparto riproduttivo, appaiono quindi cruciali per rendere un'azienda suinicola competitiva sul mercato. A tal proposito, i virus sono tra gli agenti che più condizionano negativamente le performance riproduttive, soprattutto per le conseguenze che determinano sulle scrofe gravide in termini di malattie sistemiche e aborto (Mengeling et al., 2000), seppur modulate dai fattori relativi alla gestione, all'agente e all'ospite (Althouse et al., 2019).
In questo contesto, il parvovirus suino (dapprima PPV, poi nominato PPV1 in seguito alla scoperta di altre specie) è considerato uno dei principali agenti responsabili di *reproductive failure*, i cui effetti sono riassunti nell'acronimo SMEDI (*stillbirth, mummification, embryonic death and infertility*) (Streck & Truyen, 2020). PPV1 è endemico nella maggior parte del mondo, ed è stato identificato in tutte le categorie produttive. Il principale, se non unico, segno clinico è il *reproductive failure* nelle scrofe che, in gruppi di animali non vaccinati, o in cui la vaccinazione non è stata gestita correttamente, può manifestarsi sotto forma di una vera e propria "*abortion storm*". Al contrario, in verri e in suini adulti all'ingrasso questo patogeno non sembra avere particolare rilevanza clinica.

In tassonomia, secondo quanto riportato dall'International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), il PPV1 è classificato nella famiglia dei *Parvoviridae*, sottofamiglia dei *Parvovirinae* e, a partire dal 2001, sei nuove specie di porcine parvovirus (comunemente note come PPV2-7), lo hanno affiancato, anche se la loro patogenicità ed epidemiologia sono ancora da comprendere realmente.
La circolazione di un virus ad elevato tasso evolutivo come il PPV1, deve essere guardata con interesse, in quanto può portare all'emergere di varianti con differente antigenicità e virulenza (Zimmermann et al., 2006)the complete capsid protein sequences (VP1/VP2, potenzialmente non pienamente coperte dai vaccini sinora disponibili per PPV1. A maggior ragione, la scoperta di nuove specie virali per le quali risultano carenti alcune informazioni sul ruolo epidemiologico e gli strumenti di profilassi indiretta, rappresenta una potenziale minaccia per la suinicoltura.
Alla luce delle evidenze epidemiologiche relative alle nuove specie di PPV riscontrate in altri paesi europei, risulta difficile immaginare in Italia un quadro epidemiologico che sia rimasto immutato negli anni, considerando soprattutto la peculiarità della nostra zootecnia, altamente concentrata a livello territoriale ed interconnessa.
Con l'obiettivo di approfondire le informazioni sull'epidemiologia di PPV1 e delle nuove specie di parvovirus suino in Italia, il presente studio si propone di indagarne la presenza sul territorio italiano a partire da feti provenienti da focolai di *reproductive failure* conferiti all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER) nel biennio 2019-2020.

MATERIALI E METODI

Campionamento. Il presente studio è stato condotto su campioni di feti suini conferiti all'l'IZSLER nell'ambito dell'attività diagnostica di routine nel biennio 2019- 2020, provenienti da aziende del Nord Italia con focolai di *reproductive failure* in corso.

Presso l'Istituto, gli organi di interesse (fegato, polmone, cuore e placenta) sono stati prelevati e omogenati in pool di almeno tre feti, tranne per i feti abortiti nelle prime fasi della gestazione che sono stati processati per intero. In Istituto, secondo un protocollo standardizzato, gli omogenati sono stati sottoposti preliminarmente ad analisi batteriologiche per *Escherichia coli* e *Streptococcus suis* e ad analisi molecolari per porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine circovirus 2 (PCV-2), PPV1, *Leptospira interrogans* e *Chlamydia spp*. Un'aliquota per ogni scrofa è stata conferita al Laboratorio di Malattie infettive del Dipartimento MAPS. L'IZSLER ha condiviso inoltre un database in Microsoft Excel©, successivamente ampliato con i risultati quali-quantitativi delle indagini biomolecolari condotte in questo studio per la ricerca di PPV.

Estrazione degli acidi nucleici. Dai campioni sono stati estratti gli acidi nucleici con il kit Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology), seguendo le istruzioni della casa produttrice. Durante la fase di estrazione, ad ogni campione è stata aggiunta un'aliquota di controllo interno fornito dal kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN).

Disegno e produzione del plasmide. In assenza di campioni la cui positività per le nuove specie di PPV fosse nota e per standardizzazione, è stato disegnato un plasmide contenente le sequenze dei patogeni di interesse (PPV1-7) nelle regioni target delle metodiche di real-time PCR scelte per lo studio (Miłek et al., 2019; Palinski et al., 2016).
In assenza di campioni a positività nota per le nuove specie di PPV e per standardizzazione, è stato disegnato un plasmide contenente le sequenze dei patogeni di interesse (PPV1-7) (Miłek et al., 2019; Palinski et al., 2016).
Per il disegno del plasmide, sono state scaricate da Genbank le sequenze di riferimento delle specie note di PPV. Dopo l'allineamento in MEGA X (Kumar et al., 2018) ai primer delle metodiche di riferimento, i segmenti di genoma delle varie specie di PPV contenenti le regioni target sono stati concatenati in un'unica sequenza in formato FASTA, poi inviato alla ditta Genscript Biotech (Paesi Bassi).

Metodiche duplex real-time PCR. La ricerca di PPV1 e PPV2, PPV3 e PPV6, PPV4 e PPV5 è stata svolta mediante tre *duplex* real-time PCR descritte da Miłek et al., (2019), utilizzando gli stessi primer, sonde e combinazioni di patogeni. La ricerca di PPV7 è stata eseguita secondo la metodica descritta da Palinski et al., 2016, e messa a punto in *duplex,* insieme al saggio per la valutazione del controllo interno. Le metodiche sono state eseguite con il kit QuantiFast Pathogen PCR+IC Kit (QIAGEN) e il termociclatore LightCycler® **96** Instrument (Roche).
La validazione delle metodiche di real-time PCR è stata effettuata a partire da diluizioni seriali in base 10 del plasmide concentrato 10^8 copie/µL, per la produzione delle curve standard per la quantificazione e la valutazione della sensibilità analitica.

Analisi statistica. L'analisi statistica dei dati è stata eseguita tramite Microsoft Excel©. Il titolo virale è stato quantificato nei campioni sperimentali se superiore al LOD della rispettiva metodica, mentre valori inferiori al LOD sono stati comunque considerati ma registrati come positivi non quantificabili. Le aziende di provenienza dei campioni sono state divise per anno di conferimento. Le positività rilevate per le singole aliquote sono state poi raggruppate per azienda. Sono state quindi analizzate le frequenze di positività ai PPV in funzione di anno di campionamento, positività agli altri patogeni del pacchetto diagnostico standard per *reproductive failure* e azienda. La sintesi di queste analisi è stata riportata tramite tabelle e grafici, riassuntivi delle frequenze assolute e relative.

RISULTATI

La validazione delle metodiche ha restituito i seguenti rispettivi valori di efficienza e *limit of detection* (LOD): PPV1 = 1.97 e 10^0 copie/µL; PPV2 = 2.04 e 10^1 copie/µL; PPV3 = 1.82 e 10^1 copie/µL; PPV6 = 1.87 e 10^0 copie/µL; PPV4 = 1.76 e 10^1 copie/µL; PPV5 = 1.79 e 10^1 copie/µL; PPV7 = 1.83 e 10^1 copie/µL.

I campioni oggetto delle analisi provenivano da 80 aziende, di cui 45 campionate nel 2019 e 54 nel 2020. Diciannove aziende (24,4%) hanno conferito campioni in entrambi gli anni di monitoraggio.
Complessivamente, sono stati conferiti 562 feti analizzati in 163 aliquote, ognuna corrispondente ad una scrofa.

PPV: aziende positive e co-infezioni. Nell'ottica di un aggiornamento epidemiologico del PPV1 e di una prima ricerca dei PPV2-7, in Tabella 1 sono riportate le positività sulle aziende campionate per anno.
Il primo dato epidemiologico rilevante è quanto emerge dalle aziende positive per PPV1 nel 2019 (6,7%) e nel 2020 (31,5%), per un totale di positività pari al 25% delle aziende testate, a cui solo un'azienda contribuisce in entrambi gli anni. Il PPV1 è anche la specie rilevata a concentrazioni più elevate, con alcuni campioni che hanno registrato titoli molto elevati, attorno a 10^7-10^8 copie/µL, in co-infezione rispettivamente con *Chlamydia spp.* e con PCV-3.
Di rilievo epidemiologico interessante è l'identificazione di tutti i nuovi PPV2-7 in almeno un'azienda tra quelle testate nel 2019, con una variabilità che va da un'azienda per i PPV4-5 a 9 aziende per il PPV6. Sia nel 2019 che nel 2020, le specie maggiormente identificate sono in ordine PPV6-1-3-7.

***Tabella 1**: percentuali di aziende positive ai diversi PPV per anno (45 aziende nel 2019; 54 aziende nel 2020). Le aziende campionate entrambi gli anni sono 19. *Specie di PPV presenti nella stessa azienda nel biennio 2019-2020.*
***Table 1**: percentages of farms positive for each PPVs by year (45 farms in 2019; 54 farms in 2020). Nineteen farms were sampled in both years. *PPV species present in the same farm in 2019-2020.*

	Aziende positive per patogeno (conteggio e frequenza relativa)						
Anno	**PPV1***	**PPV2**	**PPV3**	**PPV4**	**PPV5**	**PPV6**	**PPV7***
2019	3 (6,7%)	2 (4,4%)	8 (17,8%)	1 (2,2%)	1 (2,2%)	9 (20,0%)	6 (13,3%)
2020	17 (31,5%)	0 (0%)	9 (16,7%)	0 (0%)	0 (0%)	12 (22,2%)	6 (11,1%)
Totale	20 (25,0%)	2 (2,5%)	17 (21,3%)	1 (1,3%)	1 (1,3%)	21 (26,3%)	12 (15%)

La percentuale di aziende positive per almeno una specie di PPV nel 2019 e nel 2020 è risultata essere rispettivamente pari al 46,7% (21/45) e al 57,4% (31/54). Fra queste, il 23,8% (5/21) e il 29,0% (9/31) sono risultate positive per più di una specie di PPV, rispettivamente nel 2019 e nel 2020. I parvovirus riscontrati più spesso in co-infezione sono il PPV3 e il PPV6, sia nel 2019 che nel 2020, identificati nel 50% delle aziende in cui

era presente una co-infezione tra PPV (n=14).
Co-infezioni fra PPV1-7 e altri agenti. La ricerca di altri patogeni responsabili di *reproductive failure* condotta presso l'IZSLER ha riguardato tutte le 163 aliquote, tranne per il PCV-3 che è stato possibile testare solo in 107 campioni. Nel complesso, le aziende testate per PCV-3 sono 65, di cui 35 testate nel 2019, 23 nel 2020, e 7 in entrambi gli anni. Le percentuali delle aziende positive ai PPV e agli altri patogeni oggetto di screening sono riportate in Tabella 2.

***Tabella 2**: percentuali di aziende positive ai diversi agenti infettivi sul totale delle aziende campionate (n=80). *Le percentuali relative a PCV-3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate rispettivamente nel 2019 e 2020, e ad un totale di 65 aziende nel biennio (sette aziende testate sia nel 2019 che nel 2020).*
***Table 2**: percentages of farms positive for each infectious agents out of total farms sampled (n=80). *Percentages for PCV-3 refer to a total of 42 and 30 companies tested in 2019 and 2020, respectively, and a total of 65 companies in the two-year period (seven companies tested in both 2019 and 2020).*

	Aziende positive per patogeno (conteggio e frequenza relativa)							
Anno	**PPV1**	**PPV2-7**	**Batteriologico**	**PRRSV**	**PCV-2**	**PCV-3***	**Leptospira spp.**	**Chlamydia spp.**
2019	3 (6,7%)	19 (42,2%)	11 (24,4%)	7 (15,6%)	14 (31,1%)	10 (23,8%)	0 (0%)	3 (6,7%)
2020	17 (31,5%)	19 (35,2%)	12 (22,2%)	14 (25,9%)	18 (33,3%)	1 (3,3%)	4 (7,4%)	1 (1,9%)
Totale	20 (25,0%)	38 (47,5%)	23 (28,8%)	21 (26,3%)	32 (40,0%)	11 (16,9%)	4 (5,0%)	6 (7,5%)

Dalle analisi condotte presso l'IZSLER, il patogeno maggiormente identificato è il PCV-2. Le co-infezioni tra PCV-2 e almeno una specie di PPV risultano abbastanza comuni essendo state descritte nel 23,8% (19/80) del totale delle aziende testate e nel 59,4% (19/32) di quelle positive per PCV-2.
Il PPV1 è stato riscontrato come singolo agente solo in una azienda (2,2%) nel 2019 (n=45) e in 3 (5,6%) nel 2020 (n=54).
Le aziende positive a PPV1 e almeno un altro agente virale e batterico tra quelli ricercati risultano essere rispettivamente il 2,2% e il 4,4% nel 2019 (n=45) e il 20,4% e il 5,6% nel 2020 (n=54).

Complessivamente, i nuovi PPV sono stati rilevati singolarmente nel 17,8% (8/45) e nel 7,4% (4/54) delle aziende testate rispettivamente nel 2019 e nel 2020. Nessuna azienda ha registrato una positività esclusivamente per i PPV4-5, mentre il PPV2 è l'unico a essere stato individuato sempre in co-infezione con una delle altre specie tra PPV3,6,7. I parvovirus che più frequentemente sono stati rilevati in assenza di qualsiasi altro patogeno sono il PPV3 nel 2019, e il PPV6 nel 2020.
Nel 2019, le nuove specie di parvovirus sono state identificate in co-infezione con almeno uno degli altri agenti virali (PPV1 compreso) nel 20,0% (9/45) e degli agenti batterici nell'8,9% (4/45) del totale delle aziende campionate in quell'anno. Nel 2020 queste percentuali hanno raggiunto rispettivamente livelli del 22,2% (12/54) e dell'11,1% (6/54) delle aziende.
La Figura 1 riassume le percentuali delle aziende positive a PPV1 come singolo agente e in co-infezione con gli altri patogeni sul totale delle aziende testate nel relativo anno. La Figura 2 riporta la stessa sintesi relativamente alle specie PPV2-7.

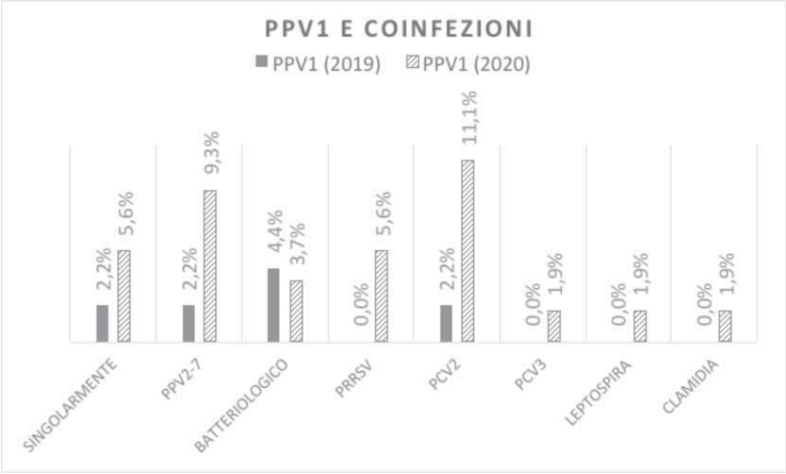


Figura 1: percentuali delle aziende positive a PPV1 come singolo agente e in co-infezione con gli altri patogeni. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di 45 aziende nel 2019 e 54 nel 2020. Le percentuali per la co-infezione PPV1 con PCV3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate per PCV3 rispettivamente nel 2019 e 2020.
Figure 1*: Percentages of farms positive for PPV1 as single agent or in co-infection with other pathogens. Percentages refer to a total number of 45 farms in 2019 and 54 in 2020. Percentages for PPV1-PCV3 co-infection refer to a total of 42 and 30 farms tested for PCV3 in 2019 and 2020, respectively.*

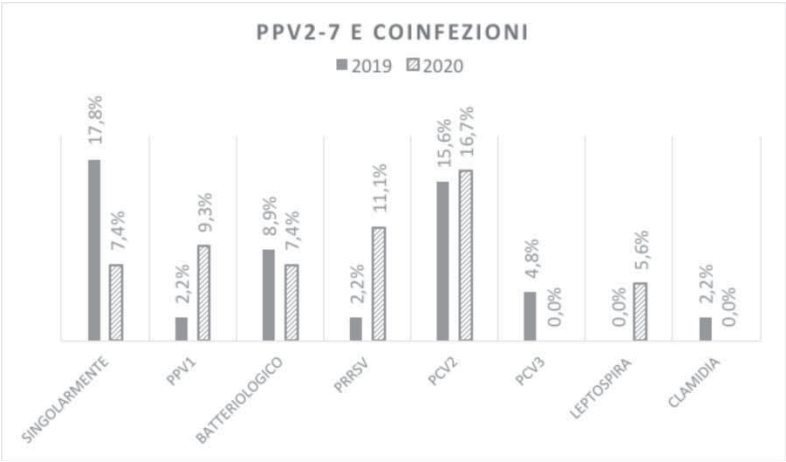


Figura 2: percentuali delle aziende positive ad almeno una delle specie PPV2-7 come singoli agenti e in co-infezione con gli altri patogeni. Le percentuali sono riferite ad un numero totale di 45 aziende nel 2019 e 54 nel 2020. Le percentuali per la co-infezione PPV2-7 con PCV3 si riferiscono ad un totale di 42 e 30 aziende testate per PCV3 rispettivamente nel 2019 e 2020.
Figure 2*: Percentages of farms positive for PPV2-7 as single agents or in co-infection with other pathogens. Percentages refer to a total number of 45 farms in 2019 and 54 in 2020. Percentages for new PPVs-PCV3 co-infection refer to a total of 42 and 30 farms tested for PCV3 in 2019 and 2020, respectively.*

DISCUSSIONE

Il presente studio fornisce sia un aggiornamento epidemiologico sulla circolazione del PPV1 sia una prima evidenza di circolazione delle nuove specie di PPV in Italia, in co-infezione e come singoli agenti.

Le frequenze riscontrate per PPV1 attestano una sua non trascurabile circolazione negli allevamenti italiani e, alla luce dell'azione non sterilizzante del vaccino ad oggi utilizzato, questo dato non deve meravigliare. Poichè il vaccino è ritenuto in grado di prevenire l'insorgenza della malattia, appare curioso il riscontro di outbreak di patologia riproduttiva in aziende positive esclusivamente al PPV1 sia nel 2019, che nel 2020. Per quanto un'inadeguata gestione della vaccinazione appaia l'ipotesi più probabile, queste evidenze non possono non stimolare importanti considerazioni e valutazioni sull' effetto sinergico del PPV1 con altri patogeni nel meccanismo patogenetico del *reproductive failure*, sulla possibile inefficacia del vaccino nel prevenire la malattia per nuovi ceppi di PPV1 (Zeeuw et al., 2007) e, parallelamente, sul possibile ruolo della vaccinazione come driver di evoluzione (Read & Mackinnon, 2010). Per rispondere a questi interrogativi saranno necessari studi dedicati che prevedano analisi di tipo filogenetico, per approfondire gli aspetti molecolari dell'epidemiologia di PPV1.

Meritevoli di discussione sono anche i risultati relativi a PPV2-7. L'aver individuato tutte le nuove specie di PPV sia come singoli agenti, ad eccezione di PPV4-5, sia in co-infezione con altri patogeni in feti raccolti da focolai di *reproductive failure*, potrebbe essere un indizio di un loro potenziale ruolo eziologico primario e/o sinergico nella patologia riproduttiva. Le diverse frequenze riscontrate per le nuove specie, oltre ad essere condizionate da motivi di natura epidemiologica, potrebbero essere imputabili al loro diverso tropismo tissutale. Studi precedenti descrivono infatti i fluidi orali come la matrice con il più alto tasso di rilevamento per quasi tutti i PPV (Miłek et al., 2019); per il PPV4 anche i tessuti fetali sembravano promettenti (Cságola et al., 2012). Nonostante la matrice analoga e la plausibilità epidemiologica della presenza di PPV4 e 5, il nostro studio ne evidenzia una circolazione molto limitata in Italia. Tuttavia, la scarsa efficienza della metodica per la ricerca di PPV4 e 5 osservata già in fase di validazione, potrebbe essere ricondotta all'utilizzo della stessa coppia di primer nella *duplex* real-time PCR. Questo rappresenta un potenziale ulteriore punto critico da indagare ed eventualmente risolvere. Questo studio descrive inoltre il rielievo delle specie PPV2-3-5 per la prima volta in casi di *reproductive failure*.

CONCLUSIONI

Il rilevamento delle nuove specie di parvovirus ha dimostrato la loro circolazione nel territorio italiano e la co-infezione con agenti patogeni per i quali è già stato descritto un sinergismo con il PPV1. Questo potrebbe far ipotizzare una rilevanza clinica per queste nuove specie virali. Tuttavia, il solo rinvenimento in campioni provenienti da focolai di rep*roductive failure* non è sufficiente per supportarne il nesso causale. Pertanto, si rendono necessari ulteriori studi dedicati e standardizzati, che prendano in considerazione soggetti sani e malati, varie matrici e categorie produttive, per verificare il reale impatto delle nuove specie di parvovirus e descriverne la circolazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Althouse, G. C., Kauffold, J., & Rossow, S. (2019). Diseases of the Reproductive System. In J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, & J. Zhang (Eds.), *Diseases of Swine, Eleventh Edition* (pp. 373–390). John Wiley & Sons, Inc.

2. Cságola, A., Lorincz, M., Cadar, D., Tombácz, K., Biksi, I., & Tuboly, T. (2012). Detection, prevalence and analysis of emerging porcine parvovirus infections. *Archives of Virology*, *157*(6), 1003–1010. https://doi.org/10.1007/s00705-012-1257-3
3. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096
4. Mengeling, W. L., Lager, K. M., & Vorwald, A. C. (2000). The effect of porcine parvovirus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus on porcine reproductive performance. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 199–210. https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00135-4
5. Miłek, D., Woźniak, A., Guzowska, M., & Stadejek, T. (2019). Detection patterns of porcine parvovirus (PPV) and novel porcine parvoviruses 2 through 6 (PPV2–PPV6) in Polish swine farms. *Viruses*, *11*(5). https://doi.org/10.3390/v11050474
6. Palinski, R. M., Mitra, N., & Hause, B. M. (2016). Discovery of a novel Parvovirinae virus, porcine parvovirus 7, by metagenomic sequencing of porcine rectal swabs. *Virus Genes*, *52*(4), 564–567. https://doi.org/10.1007/s11262-016-1322-1
7. Read, A. F., & Mackinnon, M. J. (2010). Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evolution in Health and Disease*, 139–152. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0011
8. Streck, A. F., & Truyen, U. (2020). Porcine Parvovirus. *Current Issues in Molecular Biology*, *37*, 33–46. https://doi.org/10.21775/cimb.037.033
9. Zeeuw, E. J. L., Leinecker, N., Herwig, V., Selbitz, H.-J., & Truyen, U. (2007). Study of the virulence and cross-neutralization capability of recent porcine parvovirus field isolates and vaccine viruses in experimentally infected pregnant gilts. *Journal of General Virology*, *88*, 420–427. https://doi.org/10.1099/vir.0.82302-0
10. Zimmermann, P., Ritzmann, M., Selbitz, H.-J., Heinritzi, K., & Truyen, U. (2006). VP1 sequences of German porcine parvovirus isolates define two genetic lineages. *Journal of General Virology*, *87*, 295–301. https://doi.org/10.1099/vir.0.81086-0

PREMIO
CASIMIRO TAROCCO 2022

VINCITORE

EFFETTO DELLA RIDUZIONE DELLA DISPONIBILITÀ DI ALIMENTO E DEL LIVELLO DI AMMINOACIDI NELLA DIETA SU COMPORTAMENTO ALIMENTARE, PRESTAZIONI PRODUTTIVE, ESCREZIONE DI NUTRIENTI E QUALITÀ DELLA CARNE DI MAIALI APPARTENENTI A DIVERSI TIPI GENETICI

EFFECT OF REDUCTIONS IN FEED ALLOWANCE AND DIETARY AMINO ACIDS CONTENT ON FEEDING BEHAVIOUR, GROWTH PERFORMANCE, NUTRIENT EXCRETION AND MEAT QUALITY OF GROWING PIGS BELONGING TO DIFFERENT GENETIC TYPES

CARCO' G.

Ufficio Ricerca e Sviluppo, Progeo SCA

Parole chiave: strategie alimentari, impatto ambientale, comportamento alimentare
Keywords*:* feeding strategies, environmental impact, feeding behaviour

RIASSUNTO
Questa tesi ha studiato l'effetto di una riduzione della quantità di alimento e del contenuto di amminoacidi della dieta su comportamento alimentare, escrezioni di azoto, prestazioni e qualità della carne e del prosciutto dei maiali. Novantasei maiali sono stati alimentati ad libitum (AL) o mediante una leggera restrizione alimentare (RF), con diete convenzionali (HAA) o con basso contenuto di amminoacidi (LAA). I dati raccolti da stazioni automatiche di alimentazione hanno mostrato l'effetto delle due strategie sul comportamento alimentare e le sue relazioni con performance e qualità della carcassa. Il regime RF ha ridotto le performance, il peso ed il grasso delle carcasse, ma ha aumentato l'efficienza alimentare. La dieta LAA ha avuto effetti opposti, senza alterare l'efficienza. Le due strategie hanno ridotto l'escrezione di azoto. Tra i parametri di comportamento alimentare, la velocità d'ingestione era molto correlata alle prestazioni e alle caratteristiche della carcassa: i maiali che mangiavano più rapidamente avevano maggiori accrescimenti e pesi delle carcasse e minore incidenza di tagli magri, rispetto ai maiali più lenti.
Infine, si è valutato l'effetto di una dieta LAA sulla qualità di 40 prosciutti crudi, ottenuti da due diverse linee genetiche (Danbred ed Anas): la dieta LAA ha aumentato il grasso del prosciutto.
Un lieve razionamento e le diete LAA appaiono delle buone strategie per ridurre i costi alimentari e l'impatto ambientale degli allevamenti suinicoli.

ABSTRACT
This thesis evaluated the effect of a reduction in feed allowance and in dietary amino acids (AA) on feeding behaviour, growth performance, N excretion, carcass and hams quality traits of growing pigs.
Ninety-six barrows were fed, according to an ad libitum or a restricted (RF) feeding regime with conventional (HAA) or low protein and AA diets (LAA). The data from automatic feeding stations showed the effects of both treatments on feeding behaviour and its phenotypic correlations with growth performances and carcass traits. Feed restriction decreased feed intake, carcass weight, backfat depth, but increased gain:feed ratio. The LAA diet increased feed intake, carcass weight

and the intramuscular fat content, with no effects on the feed efficiency. Both these feeding strategies reduced nitrogen excretion. Feeding patterns, especially the feeding rate, were strongly correlated with performance and carcass traits: the pigs eating faster showed greater body weights, average daily gains (ADG), carcass weights and lower proportions of lean cuts than pigs eating slowly.
Lastly, the influence of LAA diets on the quality of 40 dry-cured hams obtained from two genetic groups (Danbred and Anas) was evaluated: LAA diet increased the lipid content of the dry-cured hams.
There is a potential in the use of a mild restriction in feed allowance and in dietary protein and AA content as effective strategies to reduce the environmental impact and the N excretion of the pig industry.

INTRODUZIONE

L'allevamento per la produzione di generi alimentari è oggi responsabile del 14.5% delle emissioni globali di gas serra (Gerber et al., 2013) e l'industria suinicola produce da sola il 9% della quantità totale di gas serra emessi dal settore zootecnico. Le principali fonti di inquinamento sono le attività per la produzione degli alimenti destinati all'alimentazione del bestiame e la gestione dei liquami in allevamento.
L'indice di conversione alimentare rappresenta la capacità del maiale di convertire l'energia fornita col mangime, in energia per la crescita e varia a seconda di fattori intrinseci all'animale (età, genetica, stato di salute) ed esterni (sistema di allevamento, alimentazione). Un elevato indice di conversione è associato ad una scarsa efficienza alimentare e può determinare un aumento dei costi alimentari, delle escrezioni e quindi dell'impatto ambientale dell'allevamento. Pertanto, la suinicoltura è chiamata oggi a trovare le soluzioni più innovative per garantire prodotti eco-friendly e migliorare l'efficienza alimentare e l'economicità del processo produttivo.
A tale scopo, una restrizione alimentare e una riduzione del contenuto proteico e amminoacidico delle diete possono rivelarsi delle buone soluzioni per la riduzione delle emissioni (Osada et al., 2011). Gli effetti di tali strategie alimentari sulle performance e sulla qualità di carcassa e carne dei maiali, sono stati ampiamente studiati, anche per mezzo di stazioni automatiche di alimentazione in grado di registrare il comportamento alimentare dei maiali. Tuttavia, ancora oggi esistono pareri discordanti. Pertanto, l'obiettivo di questa ricerca è valutare l'effetto di una leggera restrizione alimentare e di una riduzione del contenuto proteico e amminoacidico della dieta su comportamento alimentare, prestazioni produttive, escrezioni di azoto, e qualità di carcassa, carne e prosciutti di maiali in accrescimento, alimentati mediante stazioni automatiche.

MATERIALI E METODI

Tutte le procedure sperimentali sono state approvate dal "Comitato Etico per la Cura e l'Utilizzo di animali a fini sperimentali" dell'Università degli Studi di Padova.

Modello sperimentale

La prova ha coinvolto 96 maiali castrati di genetica Topigs × Talent, ospitati in 8 box multipli con una densità di 12 animali/box. Ciascun box era munito di un abbeveratoio e di una stazione automatica di alimentazione (Compident Pig – MLP, Schauer Agrotronic, Austria). All'interno dello stesso box, per tutto il periodo della prova, 6 maiali sono stati alimentati ad libitum (AL) mentre i restanti mediante un regime razionato (RF) suggerito dal manuale della casa genetica. A partire dagli 83 kg di peso vivo, i maiali di 4 box sono stati alimentati con una dieta convenzionale (HAA) ed i restanti con un mangime con livelli di proteina e amminoacidi ridotti (LAA). In entrambe le diete, il contenuto di AA veniva ridotto passando dalla prima (86-118 kg PV) alla seconda fase di finissaggio (118-145 kg PV). I dettagli sulla composizione e sui valori nutrizionali dei mangimi sono riportati nelle tabelle 1 e 2. Durante il corso della prova, 4 maiali sono morti ed i loro dati rimossi; pertanto, nel database finale sono stati considerati solo 92 animali.

Composizione corporea e bilancio della lisina e dell'azoto (N)
Tutti i maiali venivano pesati con cadenza settimanale mediante una bilancia elettronica, mentre ogni 2 settimane veniva rilevato lo spessore del grasso dorsale mediante dispositivo ad ultrasuoni A-mode (Renco Lean-Meater series 12, Renco Corporation, Minneapolis, USA). A partire da questi dati, si è proceduto alla stima della composizione corporea e dell'utilizzo dell'energia, secondo le procedure descritte da Gallo et al. (2014). Per il bilancio dell'azoto, è stata prima calcolata l'ingestione di lisina digeribile standardizzata a livello dell'ileo (SID), moltiplicando il consumo giornaliero per il contenuto di lisina SID del mangime, mentre i fabbisogni di lisina SID sono stati calcolati a partire dalle equazioni suggerite dall'NRC (2012) [14, eq. 8-42 and 8-43]. Infine, l'escrezione di N è stata calcolata come N ingerito – N ritenuto, quest'ultimo calcolato a partire dalla ritenzione di proteina corporea stimata (Pr/6.25).

Macellazione, caratteristiche della carcassa, della carne e dei prosciutti crudi
Tutti i maiali sono stati macellati nello stesso giorno, dopo 24 ore di digiuno e 2 ore di riposo presso il macello, ad un peso vivo medio di 143.3 kg. Gli animali sono stati storditi e abbattuti secondo le procedure stabilite dal macello. Le carcasse sono state scaldate, pelate, eviscerate, divise in mezzene e pesate. La percentuale di carne magra è stata valutata dallo spessore del grasso dorsale e dalla profondità del lombo, misurati attraverso FOM (Fat-O-Meat'er, Carometec, Soeborg, Denmark). Quindi le carcasse sono state sezionate nei principali tagli commerciali, distinti in tagli magri e tagli grassi, dei quali sono stati registrati i pesi. Infine, su un campione di *Longissimus lomborum* (LL) per ciascuna carcassa è stata condotta l'analisi chimica secondo le procedure AOAC (2012).
Per la valutazione della qualità dei prosciutti crudi, si fa riferimento alle procedure utilizzate nell'ultimo contributo di questa tesi, dove sono stati selezionati 40 prosciutti crudi, simili a San Daniele, e rappresentativi non solo delle due diete, HAA e LAA, ma anche di due sessi (Scrofette VS Maschi Castrati) e di due tipi genetici con maggior accrescimento proteico (Danbred) e lipidico (Anas). I campioni sono stati sottoposti ad analisi di laboratorio per determinare la composizione chimica, secondo le procedure precedentemente indicate, ed altri parametri.

Comportamento alimentare
Il comportamento alimentare dei maiali è stato misurato attraverso 8 stazioni automatiche di alimentazione. I maiali del gruppo AL potevano alimentarsi senza nessun tipo di restrizione durante tutta la giornata; al contrario, i maiali RF potevano consumare porzioni della loro razione giornaliera soltanto durante tre finestre temporali: fino ad un 33% dalle ore 00:01 alle 08:00, 66% dalle 08:01 alle 16:00 e 100% dalle 16:01 alle 24:00. Quando un maiale si trovava in prossimità della stazione di alimentazione veniva riconosciuto tramite un bottone auricolare e la stazione era in grado di registrare la data, l'ora di entrata e di uscita e la quantità di mangime consumata. Se un maiale RF aveva consumato la quantità di alimento stabilita per quella finestra temporale o quel giorno, il mangime non veniva più erogato.
Durante tutto il periodo della prova, le 8 stazioni di alimentazione hanno raccolto 107 259 dati, successivamente editati mediante il software R (R Development Core Team, Vienna, Austria) e utilizzati per studiare il comportamento alimentare dei maiali.
I parametri di comportamento calcolati sono i seguenti:
- consumo giornaliero di alimento = la somma dei consumi effettuati da un maiale durante le visite giornaliere alla mangiatoia;
- numero di visite, distinte in visite vere e visite "false" (con consumo = 0);
- durata giornaliera di alimentazione = la somma della durata di tutte le visite giornaliere effettate da un maiale;
- velocità di ingestione = rapporto tra consumi medi per visita e durata media delle visite.

Analisi statistica
Tutti i dati relativi a performance, comportamento alimentare, caratteristiche della carcassa e qualità della carne e del prosciutto crudo, sono stati analizzati mediante la procedura MIXED di SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC), secondo il modello seguente:
$y = \mu + FR + AA + FR \times AA + box(AA) + e;$

dove μ= intercetta, FR = regime alimentare, AA = contenuto di amminoacidi, box(AA) = fattore random di box entro AA, FR × AA = interazione tra regime alimentare e contenuto amminoacidico, e = residuo casuale.

Per lo studio delle relazioni tra comportamento alimentare, prestazioni produttive e caratteristiche della carcassa sono state utilizzate prima una PROC GLM di SAS, per depurare i parametri di comportamento alimentare dagli effetti dei trattamenti alimentari, e poi PROC CORR. Poiché la velocità di ingestione era il parametro maggiormente correlato a prestazioni e caratteristiche della carcassa, tutti i dati sono stati suddivisi in tre classi di velocità e analizzati mediante la PROC MIXED di SAS, aggiungendo al modello precedentemente descritto l'effetto fisso della classe di velocità d'ingestione.

Tabella 1. Composizione degli ingredienti (g/kg) delle diete utilizzate nelle varie fasi.
Table 1. Ingredients composition (g/kg) of the diets used in the various phases.

	Finissaggio 1 (86 - 118 kg PV)		**Finissaggio 2 (118 - 145 kg PV)**	
	Convenzionale (HAA)	**Basso contenuto di amminoacidi (LAA)**	**Convenzionale (HAA)**	**Basso contenuto di amminoacidi (LAA)**
Mais	465.7	465.4	416.8	448
Farina di estrazione di soia decorticata	160	120	145	70
Frumento	160	200	180	220
Crusca di frumento	90	90	95	100
Farinetta di frumento	80	80	120	120
Sego e strutto (1:1)	19	19	19	18
Carbonato di calcio	14	14	13.5	13
Cloruro di sodio	4.5	4.5	4.5	4.5
Premix di vitamine e oliogoelementi	2.5	2.5	2.5	2.5
L-Lisina HCl	2.6	2.9	2.2	2.6
L-Treonina	0.8	0.9	0.8	0.8
DL-Metionina	0.6	0.5	0.5	0.4
Colina HCl	0.3	0.3	0.2	0.2

Tabella 2. Composizione chimica (g/kg), amminoacidi digeribili SID[1] (g/kg) e contenuto di energia (MJ/kg) e delle diete utilizzate nelle varie fasi.
Table 2. Chemical composition (g/kg) and energy content (MJ/kg) of the diets used during the various phases of growth.

	Finissaggio 1 (86 - 118 kg BW)		Finissaggio 2 (118 - 145 kg BW)	
	Convenzionale (HAA)	Basso contenuto di amminoacidi (LAA)	Convenzionale (HAA)	Basso contenuto di amminoacidi (LAA)
Sostanza secca	879	878	878	877
Energia netta	9.8	9.8	9.7	9.8
Proteina grezza	158	143	155	126
Amido	442	462	440	478
Lipidi	46	46	45	45
Acido linoleico	16	16	16	16
Ca	6.4	6.3	5.8	5.8
P	4.3	4.2	4.5	4.3
P disponibile	2.9	2.9	2.9	2.9
SID Lisina	8.1	7.3	7.5	6.0
SID Metionina	2.7	2.4	2.6	2.1
SID Treonina	5.4	4.9	5.2	4.2
SID Triptofano	1.6	1.4	1.6	1.3

[1] SID: amminoacidi digeribili standardizzati a livello dell'ileo.
[1] SID: standardized ileal digestible amino acid content.

RISULTATI e DISCUSSIONE

Consumi alimentari e prestazioni produttive

Il regime alimentare ha mostrato una particolare influenza sulle prestazioni produttive (Tabella 3). Rispetto ai maiali AL, i maiali RF hanno consumato minor quantità di alimento (-7%, $P < 0.001$), con una riduzione degli accrescimenti pari al 5% ($P < 0.001$), ma con un miglior indice di conversione (+2%, $P = 0.050$) durante tutto il periodo dell'esperimento. I risultati confermano come la pratica del razionamento alimentare, comunemente adottata negli allevamenti, possa migliorare l'efficienza alimentare dei maiali ed evitare pesi eccessivi e carcasse troppo grasse (Lebret, 2008). La riduzione del contenuto di AA della dieta ha determinato maggiori consumi alimentari (+7%, $P = 0.03$), che hanno portato a migliori accrescimenti (+9%, $P = 0.038$) nella fase di finissaggio, con il conseguente aumento del peso a fine esperimento (+4%, $P = 0.018$). Questi risultati sono coerenti con quanto rilevato da Chiba et al. (2002), dove una riduzione della proteina e della lisina del mangime promuoveva un aumento dell'ingestione; esistono però altri studi discordanti (Schiavon et al., 2015). La controversia può essere risolta

assumendo che l'animale, anche dinnanzi a limitazioni di tipo alimentare, cerchi sempre di mangiare la quantità di alimento necessaria a soddisfare i suoi fabbisogni, ma questa quantità può aumentare o diminuire a seconda di altri fattori esterni (ambientali, sociali, etc.) a cui è sottoposto. Questi aspetti andrebbero comunque ulteriormente approfonditi.

Bilancio della lisina e dell'azoto

La restrizione alimentare ha ridotto i consumi di lisina SID (-8%, P = 0.02) con una conseguente diminuzione del surplus di lisina rispetto ai fabbisogni (Tabella 4). La dieta LAA ha provocato solo una lieve riduzione in termini di lisina SID ingerita, nonostante il contenuto di AA fosse stato ridotto, rispetto alla dieta HAA, del 9% e del 18%, rispettivamente nella prima (87-118 kg PV) e nella seconda (118-145 kg PV) fase di finissaggio. La quantità di lisina SID ingerita dai maiali LAA riusciva a soddisfare i loro fabbisogni: per questi animali il surplus di lisina era minore di 0 (P = 0.006). Il regime RF e la dieta LAA hanno ridotto anche il consumo (P = 0.002 e P = 0.024, rispettivamente) e le escrezioni di N (-9%, P = 0.003 e -15%, P = 0.008, rispettivamente). Una riduzione di tale parametro può avere delle implicazioni positive in quelle aree geografiche sottoposte a limiti di N/ha, poiché potrebbe garantire un aumento del numero di animali per unità di terra.

Caratteristiche della carcassa, della carne e del prosciutto crudo

I pesi delle carcasse dei maiali RF alimentati con mangime LAA mostravano un coefficiente di variazione più basso rispetto agli altri gruppi; ciò suggerisce l'efficacia delle due strategie alimentari nel migliorare l'uniformità delle carcasse. I maiali RF tendevano ad avere carcasse più leggere (P =0.06) e più magre (P = 0.06), con un minor spessore del grasso dorsale (-8%, P = 0.037) e un inferiore peso dei principali tagli grassi (-5%, P = 0.047), rispetto ai maiali AL (Tabella 6). I risultati sono coerenti con lo studio di Lebret (2008), dove alla restrizione alimentare sono stati associati minori accrescimenti e una composizione più magra delle carcasse.

I maiali LAA mostravano un maggior peso della carcassa (+5%, P = 0.012) e dei principali tagli magri (+3%, P = 0.047) e grassi (+9%, P = 0.018); inoltre, la loro carne aveva più grasso intramuscolare rispetto a quella dei maiali HAA (+ 18%, P = 0.037). Nell'altro esperimento, la dieta LAA aveva aumentato la concentrazione di lipidi (+10%, P =0.05) dei prosciutti crudi analizzati, a scapito di quella proteica (-3%, P = 0.003). Ciò è in linea con lo studio di Schiavon et al. (2015), dove livelli subottimali di proteina e AA nella dieta aumentavano la quantità di grasso sottocutaneo e il grado di marezzatura delle cosce destinate alla produzione di prosciutto crudo. Un aumento del grasso intramuscolare può migliorare la qualità della carne e rappresentare un valore aggiunto nel sistema di pagamento al macello (Cisneros et al., 1996).

Comportamento alimentare e sue relazioni

L'attività alimentare dei maiali era prevalentemente diurna, con dei picchi di consumo raggiunti nella fascia oraria tra le 8.00 e le 16:00, più alti per gli animali alimentati ad libitum (Figura 1). Anche i maiali RF preferivano alimentarsi nelle ore diurne, ma la limitata disponibilità di alimento e la pressione esercitata dai maiali AL in quelle fasce orarie li spingeva ad alimentarsi anche durante la notte. La restrizione alimentare ha determinato un minor consumo di alimento in tutta la fase di finissaggio (Tabella 7). Rispetto al gruppo AL, i maiali RF hanno ridotto il numero di visite totali alla mangiatoia (-32%, P = 0.01) e aumentato il consumo ad ogni visita (+18%, P = 0.016) e la velocità d'ingestione (+15%, P = 0.016).

La riduzione del livello amminoacidico ha aumentato solo i consumi giornalieri, senza grandi alterazioni del comportamento alimentare, seppur i maiali LAA tendessero ad avere velocità d'ingestione più alta (P = 0.07).
La velocità d'ingestione era fortemente correlata alle prestazioni produttive dei maiali e alle caratteristiche delle loro carcasse. I maiali con una maggiore velocità d'ingestione presentavano maggiori consumi (+24%, P <0.01), pesi (+16%, P <0.01), ed incrementi giornalieri (+27%, P <0.01) (Tabella 8); le loro carcasse erano più pesanti (+17%, P < 0.01), con un grasso dorsale più spesso (24%, P = 0.05) e con maggior peso dei principali tagli magri (+14%, P < 0.01) e grassi (+32%, P < 0.01) (Tabella 7). I risultati erano simili a quelli ottenuti da Rauw et al. (2006), dove i maiali che mangiavano più velocemente crescevano più rapidamente ed erano più grassi. Un aumento della velocità d'ingestione sembra essere sintomo di una maggiore motivazione degli animali a nutrirsi e può essere stimolato da fattori esterni come la competizione sociale o la riduzione della disponibilità di alimento o dei nutrienti del mangime (Nielsen, 1999). I risultati suggerivano un'elevata elasticità dei maiali a modificare il loro comportamento alimentare per soddisfare i loro fabbisogni anche dinnanzi a diverse restrizioni alimentari.

Tabella 3. Prestazioni produttive di maiali alimentati *ad libitum* (AL) o razionati (RF), con diete convenzionali (HAA) o a basso contenuto (LAA) di proteina e amminoacidi.
Table 3. Growth performance of barrows fed *ad libitum* (AL) or restrictively (RF), feeds with high (HAA) or low (LAA) crude protein and indispensable AA contents.

	Regime alimentare (FR)			**Dieta (AA)**			***P***		
	AL	**RF**	**SEM**	**HAA**	**LAA**	**SEM**	**FR**	**AA**	**FR × AA**
Consumo giornaliero, kg/d									
- finissaggio	2.841	2.615	0.050	2.630	2.825	0.050	0.002	0.031	0.49
- tutta la prova	2.715	2.524	0.030	2.545	2.695	0.030	< 0.001	0.020	0.40
Peso vivo, kg:									
- inizio del finissaggio	86.0	85.3	0.90	84.9	86.3	1.06	0.48	0.41	0.85
- fine della prova	145.8	141.2	1.35	140.4	146.6	1.35	0.018	0.018	0.82
Incremento medio giornaliero, kg/d:									
- finissaggio	0.881	0.823	0.020	0.817	0.887	0.020	0.033	0.038	0.77
- tutta la prova	0.959	0.912	0.010	0.910	0.962	0.010	0.014	0.033	0.89
Indice di conversione[1]									
- finissaggio	0.307	0.311	0.003	0.306	0.312	0.003	0.49	0.28	0.050
- tutta la prova	0.352	0.359	0.003	0.355	0.356	0.003	0.050	0.93	0.09

[1]Indice di conversione = Ritmo di crescita/Consumo alimentare; G:F ratio (Growth rate/Feed intake)

Tabella 4. Bilancio della lisina e dell'azoto (N) di maiali alimentati *ad libitum* (AL) o razionati (RF), con diete convenzionali (HAA) o a basso contenuto (LAA) di proteina e amminoacidi.
Table 4. Lysine and N balance of barrows fed *ad libitum* (AL) or restrictively (RF), feeds with high (HAA) or low (LAA) crude protein and indispensable amino acid contents

	Regime alimentare (FR)			**Dieta (AA)**			***P***		
	AL	**RF**	**SEM**	**HAA**	**LAA**	**SEM**	**FR**	**AA**	**FR × AA**
Fabbisogno di lisina SID, g/d	19.1	18.1	0.45	17.9	19.2	0.45	0.11	0.08	0.34
Consumo di lisina SID (g/d)	20.5	18.9	0.36	20.3	19.1	0.36	0.002	0.06	0.63
Surplus di lisina SID, g/d	1.40	0.83	0.40	2.37	-0.15	0.43	0.26	0.006	0.10
Ingestione di N, g/d	65.9	60.7	1.16	65.7	60.8	1.16	0.002	0.024	0.66
N ritenuto, g/d	23.3	22.2	0.54	22.0	23.5	0.54	0.13	0.09	0.31
N escreto, g/d	42.5	38. 6	1.04	43.8	37.4	1.16	0.003	0.008	0.28

Tabella 5. Qualità della carcassa e della carne di maiali alimentati *ad libitum* (AL) o razionati (RF), con diete convenzionali (HAA) o a basso contenuto (LAA) di proteina e amminoacidi.
Table 5. Carcass and meat quality of barrows fed *ad libitum* (AL) or restrictively (RF) feeds with high (HAA) or low (LAA) crude protein and indispensable AA contents.

	Regime alimentare (FR)			**Dieta (AA)**			***P***		
	AL	**RF**	**SEM**	**HAA**	**LAA**	**SEM**	**AL**	**AA**	**FR × AA**
Peso della carcassa, kg	116.5	113.6	1.09	112.3	117.8	1.09	0.06	0.012	0.86
Resa, %	79.9	80.4	0.23	80.0	80.4	0.23	0.13	0.31	0.94
Spessore grasso dorsale, mm	20.8	19.1	0.69	18.9	21.0	0.81	0.037	0.12	0.29
Perc. carne magra (FOM), %	56.4	57.3	0.39	57.4	56.3	0.44	0.06	0.12	0.40
Totale tagli magri									
- Peso, kg	75.5	74.3	0.64	73.8	76.0	0.64	0.17	0.047	0.85
- Resa, % carcassa	64.8	65.5	0.36	65.7	64.6	0.43	0.13	0.10	0.97
Totale tagli grassi									
- Peso, kg	22.4	21.3	0.39	21.0	22.8	0.39	0.047	0.016	0.93
- Resa, % carcassa	19.2	18.7	0.23	18.6	19.3	0.24	0.13	0.09	0.96
Composizione della carne, %									
- umidità	70.8	70.9	0.15	71.1	70.6	0.16	0.42	0.06	0.17
- proteina	23.5	23.6	0.10	23.6	23.5	0.10	0.63	0.28	0.19
- grasso intramusculare	4.3	4.1	0.17	3.9	4.5	0.18	0.61	0.037	0.67
- ceneri	1.2	1.2	0.01	1.2	1.2	0.01	0.76	0.67	0.93

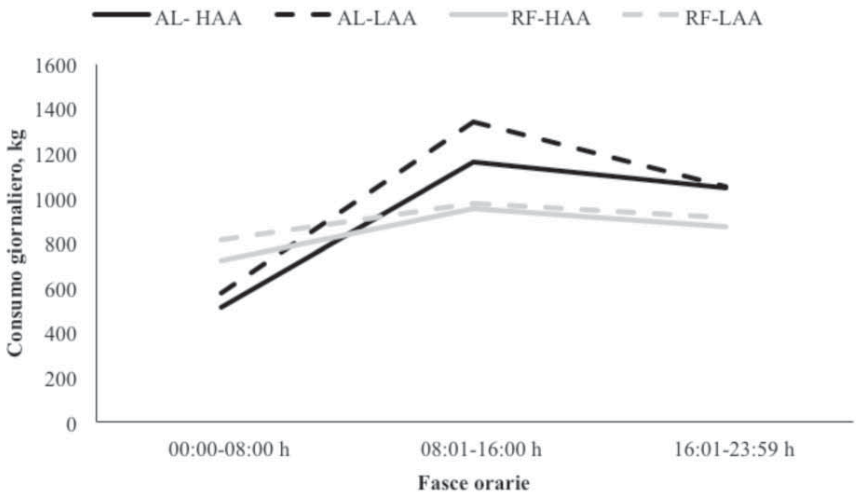


Figura 1. Andamento dei consumi giornalieri di maiali alimentati *ad libitum* (AL) o razionati (RF), con diete convenzionali (HAA) o a basso contenuto (LAA) di proteina e amminoacidi durante tutta la fase di finissaggio.
Figure 1. Daily intake trend of barrows fed *ad libitum* (AL) or restrictively (RF), feeds with high (HAA) or low (LAA) crude protein and indispensable amino acid contents during finishing phase.

Tabella 6. Comportamento alimentare di maiali alimentati *ad libitum* (AL) o razionati (RF), con diete convenzionali (HAA) o a basso contenuto (LAA) di proteina e amminoacidi durante tutta la fase di finissaggio.
Table 6. Feeding behaviour of barrows fed *ad libitum* (AL) or restrictively (RF), feeds with high (HAA) or low (LAA) crude protein and indispensable amino acid contents during finishing phase.

	Regime alimentare (FR)			**Dieta (AA)**			***P***		
	AL	**RF**	**SEM**	**HAA**	**LAA**	**SEM**	**AL**	**RF**	**SEM**
Consumo giornaliero, kg/d	2841	2615	48.4	2630	2826	48.4	0.002	0.031	0.49
Tempo di alimentazione, min/d	59.4	49.8	1.5	55.8	53.4	1.6	<0.001	0.31	0.29
Visite “false”, n	1.8	0.8	0.2	1.5	1.2	0.3	<0.001	0.26	0.47
Visite “vere”, n	10.2	7.4	0.9	8.2	9.4	1.0	0.001	0.45	0.07
Consumo per visita, g	347	411	23.3	379	379	27.2	0.016	1.00	0.09
Durata di una visita, min	7.2	7.6	0.4	7.9	6.8	0.5	0.45	0.14	0.33
Velocità d’ingestione, g/min	49.1	56.4	2.1	49.3	56.2	2.2	0.016	0.07	0.50

Tabella 7. Influenza della velocità d'ingestione sulle prestazioni produttive dei maiali.
Table 7. Influence of feeding rate on the growth performance of barrows.

	Classi di velocità d'ingestione (g/min)				***P*** [1]	
	da 12.6 a 38.2	**da 38.3 a 51.6**	**da 52.1 a 118.9**	**SEM**	**L**	**Q**
Peso vivo finale, kg	131.6	146.1	152.4	2.91	<0.001	0.24
Consumo alimentare, kg/d	2.296	2.707	2.845	0.07	<0.001	0.11
Incremento medio giornaliero, kg/d	0.807	0.975	1.021	0.03	<0.001	0.07
Indice di conversione[2], kg/d	0.352	0.360	0.360	0.01	0.39	0.65

[1] L = lineare, Q = quadratico.
[2]Indice di conversione = Incremento medio giornaliero/Consumo alimentare; G:F ratio (Growth rate/Feed intake)

Tabella 8. Influenza della velocità d'ingestione sulla qualità della carcassa e della carne.
Table 8. Influence of feeding rate on the carcass and meat quality traits of barrows.

	Classi di velocità d'ingestione (g/min)				***P*** [1]	
	da 12.6 a 38.2	**da 38.3 a 51.6**	**da 52.1 a 118.9**	**SEM**	**L**	**Q**
Peso della carcassa, kg	105.1	117.2	122.5	2.33	<0.001	0.25
Resa, %	0.80	0.80	0.81	0.01	0.45	0.93
Spessore grasso dorsale, mm	16.5	20.9	20.4	1.41	0.05	0.16
Percentuale carne magra (FOM), %	56.6	53.9	54.3	2.26	0.42	0.51
Totale tagli magri						
- Peso, kg	68.8	76.1	78.6	1.41	<0.001	0.28
- Resa, % carcassa	66.5	64.9	64.1	0.68	0.014	0.58
Totale tagli grassi						
- Peso, kg	18.5	22.4	24.5	0.82	<0.001	0.37
- Resa, % carcassa	17.6	19.2	20.1	0.49	<0.001	0.51
Composizione della carne, %	71.6	70.8	70.9	0.36	0.15	0.29
- umidità	23.5	23.7	23.4	0.24	0.87	0.34
- proteina	3.74	4.31	4.53	0.40	0.18	0.72
- grasso intramuscolare	1.18	1.18	1.18	0.01	0.90	0.98

[1] L = lineare, Q = quadratico.

CONCLUSIONI

1) Una leggera restrizione alimentare ha determinato:
   - -7% ingestione giornaliera
   - +2% efficienza alimentare
   - - 9% escrezioni di azoto
   - +36% uniformità delle carcasse
   - -27% numero di visite, ma +20% consumo per visita e +10% velocità d'ingestione
2) Una riduzione del contenuto di proteina e AA della dieta ha provocato:
   - +7% ingestione giornaliera
   - - 15% escrezioni di azoto
   - +5% peso delle carcasse
   - +17% contenuto di grasso intramuscolare della carcassa e +10% di grasso nel prosciutto crudo
   - +15% velocità d'ingestione (P = 0.07)
3) Il comportamento alimentare era correlato alle performance e alla qualità della carcassa; un aumento della velocità d'ingestione ha portato a:
   - + 16% incremento medio giornaliero
   - + 16% peso della carcassa
   - +14% contenuto di grasso della carcassa

1) I maiali erano in grado di modificare il loro comportamento alimentare per soddisfare i loro fabbisogni.

In conclusione, l'uso di una leggera restrizione alimentare o di diete a basso contenuto proteico e amminoacidico può rivelarsi una buona strategia per ridurre l'impatto ambientale degli allevamenti suinicoli.

BIBLIOGRAFIA

1. Gerber P.J., Steinfeld H., Henderson B., Mottet A., Opio C., Dijkman J., Falcucci A., Tempio G. (2013), "Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities." Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, 35-37.
2. Osada T., Takada R., Shinzato I. (2011), "Potential reduction of greenhouse gas emission from swine manure by using a low-protein diet supplemented with synthetic amino acids." Anim. Feed. Sci. Technol., 166-67: 562-574.
3. Gallo L., Dalla Montà G., Carraro L., Cecchinato A., Carnier P., Schiavon S. (2014), "Growth performance of heavy pigs fed restrictively diets with decreasing crude protein and indispensable amino acids content." Livest. Sci., 16: 130-138.
4. NRC, (2012), "Nutrient Requirements of Swine." 11th revised ed. Washington: National Academy Press.
5. AOAC (2012), "Official Methods of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists" 19th ed. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
6. SAS Institute, Inc., (2009). SAS/STAT®. 9.4. Cary, NC.
7. Lebret B. (2008), "Effects of feeding and rearing systems on growth, carcass composition and meat quality of pigs." Anim. 2: 1548-1558.
8. Chiba L.I., Kuhlers D.L., Frobish L.T., Jungst S.B., Huff-Lonergan E.J., Lonergan S.M., Cummins K.A, (2002), "Effect of dietary restrictions on growth performance and carcass quality of pigs selected for lean growth efficiency." Livest. Prod. Sci., 74: 93-102.
9. Schiavon S., Carraro L., Dalla Bona M., Cesaro G., Carnier P., Tagliapietra F., Sturaro E., Galassi G., Malagutti L., Trevisi E., Crovetto G.M., Cecchinato A., Gallo L., (2015), "Growth performance, and carcass and raw ham quality of crossbred heavy pigs from

four genetic groups fed low protein diets for dry-cured ham production." Anim. Feed Sci. Technol., 208: 170–181.
10. Cisneros F., Ellis M., Baker D.H., Easter R.A., McKeith F.K., (1996), "The influence of short term feeding of amino acid-deficient diets and high dietary leucine levels on the intramuscular fat content of pig muscle." Anim. Sci., 63: 517-522.
11. Rauw W.M., Soler J., Tibau J., Reixach J., Raya L.G., (2006), "Feeding time and feeding rate and its relationship with feed intake, feed efficiency, growth rate, and rate of fat deposition in growing Duroc barrows." Am. Soc. Anim. Sci., 84: 3404–3409.
12. Nielsen B.L., (1999), "On the interpretation of feeding behaviour measures and the use of feeding rate as an indicator of social constraint." Appl. Anim. Behav. Sci., 63: 79–91.

PREMIO
CASIMIRO TAROCCO 2022

CANDIDATI

INDAGINE SUL BENESSERE ANIMALE IN ALLEVAMENTI SUINICOLI EMILIANI

ANIMAL WELFARE SURVEY IN PIG HOLDINGS IN EMILIA-ROMAGNA

CAVAZZONI A.

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

Parole chiave: Benessere, Suini, Emilia-Romagna
Keywords: Welfare, Pigs, Emilia-Romagna

RIASSUNTO
La presente trattazione si concentra sull'applicazione del sistema IBA 2.0 (Indice di Benessere dell'Allevamento), messo a punto dal CRPA di Reggio Emilia per la valutazione del welfare dei suini, a 10 allevamenti suinicoli emiliani, con la finalità di raccogliere dati relativi ad alcuni indicatori di benessere del suino pesante italiano allevato in Emilia e mettere in evidenza i punti critici e i punti di forza di tale produzione. I dati sul benessere animale presentati sono stati raccolti tramite rilievi diretti in allevamento, con la compilazione di una checklist.
I punteggi IBA ottenuti da ciascuna azienda sono stati correlati ai livelli di biosicurezza aziendale, calcolati con il sistema Biocheck.UGent (https://biocheck.ugent.be/en) e alla prevalenza di lesioni al macello.
Le criticità riscontrate più frequentemente erano relative all'insufficiente numero di abbeveratoi, le carenze di ventilazione, la lunghezza insufficiente dei trogoli, l'assenza di arricchimento ambientale.
Le misure dirette sugli animali hanno evidenziato, nel settore riproduzione, criticità relative principalmente a lesioni da strutture e stereotipie orali nelle scrofe in gabbia parto/gestazione.
Nel settore ingrasso, la maggiore criticità evidenziata attraverso le misure dirette, era il livello di sporcizia degli animali, probabilmente dovuto alla densità eccessiva dei suini.
Tra le lesioni rilevate sugli animali al macello, è risultata sopra la media nazionale la prevalenza di dermatite da rogna sarcoptica e di ulcere soleari gravi. Nessuna azienda è risultata al di sotto della media nazionale per tutte le tipologie di lesioni considerate.

ABSTRACT
This article focuses on the application of the IBA 2.0 system (Index of Welfare of Livestock), developed by the CRPA of Reggio Emilia for the evaluation of the welfare of pigs, in 10 pig farms in Emilia, with the aim of collecting data relating to some welfare indicators of the Italian heavy pig reared in Emilia and highlighting the critical points and strengths of this production. The submitted animal welfare data were collected through direct farm surveys, with the compilation of a checklist.
The IBA scores obtained by each farm were related to the farm biosecurity levels, calculated with the Biocheck.UGent system (https:///biocheck.ugent.be/en) and the prevalence of slaughterhouse injuries.
The most frequent findings in the Design criteria evaluation were related to the insufficient number of drinking troughs, the lack of ventilation, the insufficient length of the troughs, the absence of environmental enrichment.
The Animal criteria evaluation has shown, in the reproduction sector, criticalities mainly related to lesions from structures and oral stereotypies in sows in farrowing/gestation cages.

In the fattening sector, the main problem highlighted by the direct measures was the level of dirt in the animals, probably due to the excessive density of the pigs.
Among the lesions found in animals at the slaughterhouse, the prevalence of sarcoptic mange dermatitis and severe soleal ulcers was above the national average. No company was below the national average for all types of injuries considered.

INTRODUZIONE

Non esiste, ad oggi, una definizione ufficiale globalmente accettata di benessere, nonostante gli studiosi ne abbiano proposte diverse, così come si sono dibattuti a lungo su quale sia la direzione che lo studio del welfare debba seguire, quali siano i metodi di ricerca e i mezzi per interpretarlo (Cornish et al., 2016).
L'OIE afferma che "il benessere animale è "lo stato mentale e fisico di un animale in relazione all'ambiente in cui vive e muore" (https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-welfare/) e che "l'animale si trova in un buon stato di benessere se (in base a prove scientifiche) è in salute, si trova in ambiente confortevole, è ben nutrito, al sicuro, in grado di esprimere il proprio comportamento innato e se non soffre di stati spiacevoli come dolore, paura e stress" (Cornish et al.,2016). Il modo in cui il benessere viene definito è importante, perché influenza il protocollo usato per misurarlo. Mentre la definizione di welfare continua ad evolvere, gli scienziati concordano sul fatto che esso sia un concetto multidimensionale (Wigham et al., 2018), in quanto esso dipende dalla contemporanea influenza di diversi fattori, ambientali, manageriali e propri dell'animale stesso, sia dal punto di vista fisico che psicologico, e dalla sua capacità di adattarsi alla situazione in cui si trova a vivere. Perché è importante il benessere animale?
Nel 2012, la Cambridge Declaration of Consciousness ha stabilito il consenso della comunità scientifica sul fatto che gli animali hanno basi neuroanatomiche, neurochimiche, neurofisiologiche di uno stato di coscienza, assieme alla capacità di eseguire comportamenti intenzionali. Riconoscere gli animali come esseri coscienti, pone un'importante questione etica, in quanto laddove si è in grado di provare sensazioni, si è anche in grado di provare dolore, sofferenza. (Harnad, 2016)
La questione etica, inoltre, è fortemente connessa ad altri due temi fondamentali: la qualità e la sostenibilità del prodotto, le quali a loro volta sono direttamente collegate alla percezione del consumatore (Broom,2010). Ad oggi, la questione del benessere animale ha assunto un ruolo chiave tra le preoccupazioni del consumatore, come confermato da numerose indagini statistiche (Di Pasquale et al., 2014).
I consumatori associano il benessere degli animali allevati ad altri attributi qualitativi del prodotto, di conseguenza i prodotti animal-friendly sono considerati più salubri, più sicuri, più igienici, più autentici, ecosostenibili, tradizionali e addirittura più saporiti. (Alonso et al., 2020)
Allo stesso tempo, i consumatori correlano bassi livelli di animal welfare ad una scarsa qualità del prodotto, evidenza oltretutto dimostrata empiricamente in letteratura (Alonso et al., 2020).

Questo comporta due importanti risvolti economici: il consumatore è disposto a pagare di più per prodotti animal-friendly (Di Pasquale et al., 2014) e viceversa può rifiutarsi di acquistare prodotti da aziende o Paesi con scarsa attenzione al benessere, come è successo in seguito a numerosi "scandali" denunciati dai mass media internazionali (i quali, tra l'altro, sono il principale mezzo con cui i cittadini si informano sul benessere animale [Rubini et al., 2021]).

MATERIALI E METODI

La raccolta dei dati si è svolta in 6 aziende partner che hanno reso disponibili per il progetto 10 allevamenti suinicoli a diverso indirizzo produttivo, selezionati secondo criteri di

rappresentatività della realtà suinicola regionale e di disponibilità degli allevatori titolari: per tutelarne la privacy, ciascun allevamento è stato indicato col nome ABF seguito da un numero da 1 a 10.
ABF 1 e ABF 2 erano allevamenti da riproduzione, ABF 3 da riproduzione con una parte di ingrasso, ABF 4 dal post-svezzamento all'ingrasso, ABF 5 magronaggio, e ABF 6-10 ingrasso.
I dati sul benessere animale presentati in questo studio sono stati raccolti tramite rilievi diretti in allevamento, una visita per ciascun allevamento, per un totale di 10 visite.

La scheda IBA 2.0

Come strumento di valutazione del welfare è stato utilizzato il sistema IBA 2.0 (Indice di Benessere dell'Allevamento), messo a punto dal CRPA. Le schede IBA utilizzate per il rilievo dei dati in campo si riportano in Allegato I.
La metodologia IBA, creata nel 2004, ha subito numerose modifiche e ampliamenti fino alla versione 2018 IBA 2.0; i rilievi del presente studio in particolare sono stati effettuati utilizzando IBA_Suini, sviluppato per i suini da riproduzione e da ingrasso. Il sistema attribuisce un indice IBA e una classe a ogni singolo allevamento. L'indice è una sommatoria di punteggi assegnati ai singoli parametri valutati.
Il valore dell'indice IBA posiziona l'azienda in uno dei 6 livelli prestabiliti di benessere animale (classe):
- Classe 1: livello PESSIMO;
- Classe 2: livello SCARSO;
- Classe 3: livello SUFFICIENTE;
- Classe 4: livello DISCRETO;
- Classe 5: livello BUONO;
- Classe 6: livello OTTIMO.

La metodologia IBA_Suini prevede le seguenti azioni in successione:
1. Visita in allevamento con compilazione di una checklist composta da diverse schede;
2. Input dei dati raccolti in programma informatico di calcolo;
3. Restituzione automatica da parte del programma di calcolo dei punteggi assegnati ai singoli parametri, dell'indice IBA e della classe ottenuta;
4. Individuazione degli interventi migliorativi in relazione alle criticità del punto precedente con verifica della loro sostenibilità economica (analisi costi/benefici);
5. Compilazione della scheda aziendale riassuntiva che riporta indice e classe IBA, punti critici e interventi migliorativi.
La checklist aziendale è suddivisa in diverse schede:
- Scheda A: Gestione;
- Scheda B: Edificio;
- Scheda C: Fecondazione/gestazione
- Scheda D: Maternità
- Scheda E: Post-svezzamento
- Scheda F: Ingrasso/rimonta
L'intera checklist, esclusa la scheda A, può essere compilata dal solo rilevatore mediante osservazione, misurazione e valutazione. Gli unici strumenti in dotazione al rilevatore sono un flessometro da 5 m e un distanziometro laser.
Per ogni unità aziendale, intesa come entità produttiva completa identificata da una ragione sociale, è necessario compilare una scheda A (Gestione); una scheda B per ogni edificio zootecnico; e una scheda per ogni categoria suina stabulata all'interno di un singolo edificio (C, D, E, F). In questo studio, per i siti da magronaggio, è stata utilizzata la scheda F (ingrasso/rimonta).

La durata media di un rilievo in allevamento varia da 60 a 180 minuti a seconda della dimensione aziendale e del numero di ricoveri zootecnici presenti.
I parametri riguardano sia rilievi indiretti relativi ad aspetti gestionali, strutturali e stabulativi, sia rilievi diretti su tutte le categorie suine (ingrasso, rimonta, post-svezzamento, suinetti sotto-scrofa, scrofe in gabbia e scrofe gestanti in gruppo. Il punteggio complessivo relativo ai rilievi indiretti è dato dalla somma dei punteggi parziali relativi a Gestione, Edifici e Stabulazione.

Biosicurezza
Sono stati raccolti dati *ex ante* sul livello di biosicurezza aziendale. Per farlo, è stato adottato il protocollo BioCheck.UGent, sviluppato dall'Università belga di Gent (https://biocheck.ugent.be/en). Biocheck.UGent è un sistema di punteggio per l'analisi del rischio di biosicurezza negli allevamenti, su base scientifica e indipendente. Dalla compilazione del questionario Biocheck.UGent, reperibile sul sito dell'università di Gent, si è ottenuto un rapporto riassuntivo, elaborato in automatico dal sistema BioCheck.UGent, comprensivo di indicazioni utili per capire e confrontare il livello di sicurezza aziendale con quello di migliaia di altri allevamenti suinicoli che nel mondo hanno utilizzato questo strumento.
Il punteggio totale e i punteggi parziali per ogni sottocategoria sono confrontati con quelli medi calcolati a livello nazionale ed internazionale.

Lesioni al macello
Infine, nell'ambito del GOI, in collaborazione con un'azienda di consulenza zootecnica, Suivet di Reggio Emilia, è stata valutata la prevalenza delle lesioni agli organi su un campione rappresentativo per ogni azienda di capi macellati nel periodo autunnale.
Le osservazioni raccolte durante le sedute di macellazione degli animali provenienti dall'ingrasso aziendale si sono concentrate sui polmoni, le pleure, il fegato ed il pericardio. Inoltre, sono state valutate le ulcere gastriche e le lesioni della cute, in particolare quelle relative ai graffi sulla carcassa, lesioni alla coda ed alle orecchie, dermatite da rogna, e ulcere della suola dell'unghiello.

Analisi statistica
Le eventuali correlazioni fra i vari punteggi elaborati sono state analizzate utilizzando il pacchetto Statistica 6.0. La soglia di significatività è stata fissata a $p<0.05$. Valori di p compresi fra detta soglia ed il valore di 0.1 sono stati considerati tendenze. Occorre precisare che, stante le limitate dimensioni del campione, i risultati di tale analisi possono assumere solo un carattere puramente indicativo.

RISULTATI E DISCUSSIONE
Nel presente capitolo vengono descritte sia le risultanze individuali delle singole aziende, sia l'analisi complessiva dei risultati, prendendo in esame in particolare i punteggi IBA ed i riscontri relativi agli "Animal Criteria" misurati tramite osservazione diretta degli animali.
Scopo primario di questa trattazione è concentrarsi sulla valutazione delle condizioni di benessere dei suini attraverso l'analisi dei punteggi IBA. Gli esiti della biosicurezza vengono solo commentati e i riscontri per ogni azienda si riportano nell' Allegato II.
Nelle seguenti tabelle 1 e 3 sono riportati i risultati relativi alle misurazioni dirette effettuate sugli animali nei diversi allevamenti. Nelle tabelle 2 e 4 sono riportati i punteggi benessere assegnati ai singoli allevamenti dal sistema IBA. Nella tabella 1 si può osservare come, nel settore riproduzione, le principali criticità relative agli animal criteria riguardassero principalmente le lesioni da strutture e le stereotipie orali nelle scrofe in gabbia parto/gestazione. Nella tabella 3, relativa al settore ingrasso, è evidente come la maggiore criticità evidenziata attraverso le misure dirette, fosse il livello di sporcizia degli animali.

Tabella 1: Misurazioni dirette allevamento da riproduzione
Table 1: Animal criteria for breeding farms

TIPO DI RILIEVO	% CAPI PROBLEMA			
POST-SVEZZAMENTO	AZIENDA 1	AZIENDA 2	AZIENDA 3	AZIENDA 4
Livello pulizia corporea	1,5	0,0	0,3	0,0
Cannibalismo coda	0,0	0,0	0,0	0,0
Cannibalismo orecchie	0,3	2,2	0,3	0,7
Stress termico	0,0	0,0	0,0	0,0
Diarrea	1,5	0,0	0,0	0,0
SUINETTI SOTTOSCROFA				
Stress termico	0,0	0,0	0,0	
Diarrea	0,0	0,0	0,0	
Lesioni a testa e zampe	0,6	0,0	3,7	
Altre lesioni (da box)	0,0	0,0	0,0	
SCROFE IN GABBIA PARTO				
Lesioni da strutture	20,0	0,0	4,8	
Lesioni alla vulva	0,0	0,0	4,8	
Stereotipie orali	0,0	0,0	16,7	
SCROFE IN GABBIA GESTAZIONE				
Lesioni da strutture	13,3	0,0	12,8	
Lesioni alla vulva	0,0	0,0	0,0	
Stereotipie orali	0,0	16,7	12,8	
SCROFE GESTANTI IN GRUPPO				
Livello di pulizia corporea	1,3	0,0	0,0	
Test di avvicinamento	0,0	0,0	0,0	
Zoppie	0,0	0,0	1,3	
Lesioni alla vulva	0,0	0,0	0,0	

Tabella 2: Punteggi IBA per allevamenti da riproduzione
Table 2: IBA scores for breeding farms

	AZIENDA 1	AZIENDA 2	AZIENDA 3	AZIENDA 4
A. GESTIONE	3,0	11,5	32,0	2,0
B. STRUTTURE	18,7	20,7	16,6	15,1
C. FECONDAZIONE-GESTAZIONE	1,9	6,3	19,8	0,0
D. MATERNITA'	1,5	-4,4	2,1	0,0
E. POST-SVEZZAMENTO	12,8	16,3	23,5	9,5
PUNTEGGIO MISURAZIONI INDIRETTE	23,6	38,5	68,4	17,1
MD POST-SVEZZAMENTO	55,0	36,1	55,0	55,0
MD MATERNITA'	78,5	110,0	10,0	0,0
MD FECONDAZIONE	78,5	78,5	47,0	0,0
PUNTEGGIO MISURAZIONI DIRETTE	212,0	224,6	112,0	55,0
PUNTEGGIO IBA TOTALE	**235,6**	**263,1**	**180,4**	**72,1**
CLASSE IBA	DISCRETO	BUONO	DISCRETO	SUFFICIENTE

Tabella 3: Misurazioni dirette allevamento da ingrasso
Table 3: Animal criteria for fattening farms

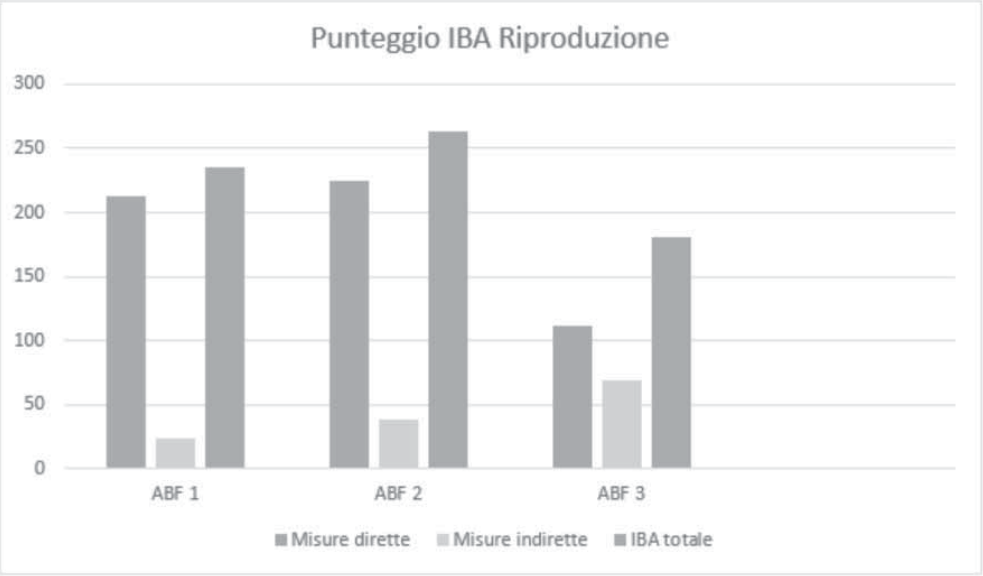
TIPO DI RILIEVO	% CAPI PROBLEMA							
INGRASSO	AZIENDA 3	AZIENDA 4	AZIENDA 5	AZIENDA 6	AZIENDA 7	AZIENDA 8	AZIENDA 9	AZIENDA 10
Livello pulizia corporea	0,0	39,7	14,1	25,1	21,7	4,7	0,0	66,7
Cannibalismo coda	0,5	0,0	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,0
Cannibalismo orecchie	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0
Test di avvicinamento	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0
Ernie	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,9	0,0	0,0
Bursiti	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,0	2,2	0,4
Prolassi rettali	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Zoppia grave	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4
Scolo oculare	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,2

Tabella 4: Punteggi IBA per allevamenti da ingrasso

	AZIENDA 3	AZIENDA 4	AZIENDA 5	AZIENDA 6	AZIENDA 7	AZIENDA 8	AZIENDA 9	AZIENDA 10
A. GESTIONE	24,0	-1,0	3,5	0,5	3,0	3,0	12,0	11,0
B. STRUTTURE	21,0	9,0	21,7	12,5	11,5	15,6	23,9	12,0
F. SISTEMI DI STABULAZIONE	15,2	-2,6	3,3	6,6	11,0	8,6	13,2	2,4
PUNTEGGIO MISURAZIONI INDIRETTE	60,2	5,4	28,5	19,6	25,5	27,2	49,1	25,4
LIVELLO DI PULIZIA CORPOREA	14,0	-5,0	0,0	0,0	0,0	14,0	14,0	-5,0
CANNIBALISMO CODA	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0
CANNIBALISMO ORECCHIE	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	-10,0	14,0	14,0
TEST DI AVVICINAMENTO	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
ERNIE	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
BURSITI	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
PROLASSI RETTALI	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
ZOPPIA GRAVE	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0	14,0
SCOLO OCULARE	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	0,0
PUNTEGGIO MISURAZIONI DIRETTE	66,0	47,0	52,0	52,0	52,0	42,0	66,0	45,0
PUNTEGGIO IBA TOTALE	**126,2**	**52,4**	**80,5**	**71,6**	**77,5**	**69,2**	**115,1**	**70,4**
CLASSE IBA	BUONO	DISCRETO	DISCRETO	DISCRETO	DISCRETO	DISCRETO	BUONO	DISCRETO

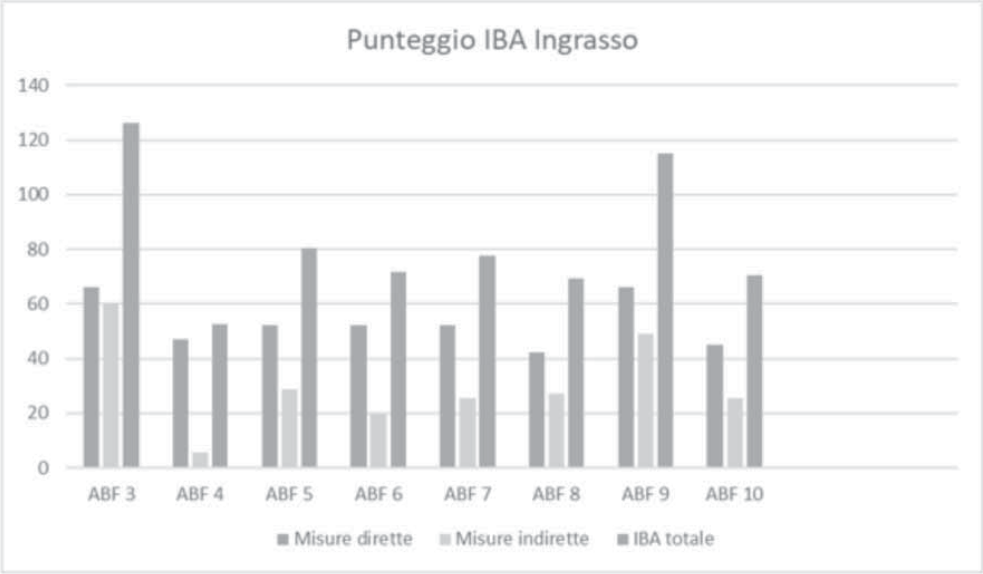
Di seguito vengono riportati i grafici 1 e 2, relativi ai punteggi IBA ottenuti da ciascun allevamento.

Grafico 1: Punteggi IBA settore riproduzione
Graphic 1: IBA scores for breeding farms



Animal criteria Design criteria Tot IBA score

Grafico 2: Punteggi IBA settore ingrasso
Graphic 2: IBA scores for fattening farms



Nel grafico 1 sono rappresentati i punteggi IBA ottenuti dagli allevamenti da riproduzione: l'azienda ABF 2 ha ottenuto il più alto punteggio IBA totale.
L'azienda ABF 3 ha ottenuto il punteggio IBA totale più basso tra gli allevamenti da riproduzione, nonostante l'elevato punteggio ottenuto per le misure indirette, ed ha invece ottenuto il più alto punteggio benessere tra gli ingrassi, seguito da ABF 9, come osservabile nel grafico 2. Il punteggio più basso, tra gli ingrassi, è stato assegnato all'allevamento ABF 4.

DISCUSSIONE

Sistemi di abbeverata

Per quanto riguarda la valutazione del benessere, le criticità riscontrate più frequentemente negli allevamenti presi in esame erano innanzitutto strutturali: il numero di abbeveratoi era insufficiente in almeno un settore in 9 allevamenti su 10.

Temperatura e densità

In alcuni ricoveri dei 10 allevamenti sono state rilevate densità di animali prossime e in alcuni casi superiori ai limiti di legge. Per la fase d'ingrasso del suino pesante, l'EFSA e diversi studi (Vitali et al., 2021) (Nannoni et al., 2019) considerano insufficiente per il benessere e la produttività del suino pesante la superficie minima di 1 m²/capo oltre il peso vivo di 110 kg.
Un parametro utile per valutare in maniera diretta sugli animali se lo spazio per capo sia sufficiente, è il livello di pulizia degli animali (Vitali et al., 2021). Tra i 10 allevamenti

presi in esame, la sporcizia dei capi (valutata come imbrattamento di più del 60% della superficie corporea), era un problema in 2 allevamenti su 3 da riproduzione (ABF 1 e ABF 3, nonostante avessero un più elevato livello di biosicurezza rispetto ad ABF 2) e in tutti gli ingrassi, ad eccezione di ABF 9. La percentuale maggiore di animali sporchi è stata rilevata negli ingrassi ABF 10 e ABF 4 e non risulta correlata al livello di biosicurezza aziendale. Questo suggerisce come il livello di sporcizia non fosse dovuto tanto ad una scarsa igiene nella gestione degli animali, quanto ad una densità eccessiva, nonostante questa fosse sopra al limite di legge solo in alcuni ricoveri di 3 dei 10 allevamenti (ABF 1, ABF 4 e ABF 10). Da notare come questi 3 allevamenti fossero anche quelli con la maggior percentuale di animali sporchi, rispettivamente tra le aziende da riproduzione e tra gli ingrassi (1,5% in ABF 1, 66,7% in ABF 10, 39,7% in ABF 4).

Fattori di rischio per la morsicatura della coda

Gli altri fattori di rischio enunciati nella raccomandazione UE 2016/336 sono la temperatura ambientale, la qualità dell'aria, lo stato di salute degli animali, la dieta e la competizione tra animali per l'alimento e per lo spazio. Relativamente alla competizione alimentare, è necessario rimarcare che in 7 aziende su 10 il fronte trogolo era di lunghezza insufficiente. Nonostante la legge non specifichi quali misure debbano avere le mangiatoie, anche la riduzione della competizione alimentare è un requisito legale, così come la presenza di materiali di arricchimento, che non solo dovrebbe essere presente, ma dovrebbe anche essere di qualità ottimale o subottimale (Vitali et al., 2021) e soprattutto essere pulito, in quanto i suini perdono presto interesse nei confronti dei materiali di arricchimento sporchi (Nannoni et al., 2020). Tra le 10 aziende analizzate nel presente studio, tutti gli allevamenti da riproduzione (ABF 1, ABF 2 e ABF 3), il post-svezzamento di ABF 4 e 2 ingrassi (ABF 8 e ABF 10) presentavano carenze nei sistemi di arricchimento ambientale, che in alcuni casi (ABF 3) era completamente assente. La morsicatura delle orecchie era presente in tutti gli allevamenti da riproduzione (ABF 1, ABF 2 e ABF 3), nel post-svezzamento di ABF 4 e nell'ingrasso ABF 8. La prevalenza di casi di morsicatura della coda, compresa tra le misure dirette delle schede IBA sia per la riproduzione (post-svezzamento) sia per l'ingrasso, è un parametro scarsamente significativo, in quanto, come precedentemente affermato, la quasi totalità degli allevamenti partner attuava il taglio della coda sui suinetti di routine.

Qualità dell'aria

Per quanto riguarda la qualità dell'aria, nonostante le numerose carenze di ventilazione, solo 1 allevamento su 10 mostrava lesioni polmonari sopra la media nazionale autunnale (Scollo et al., 2017), tutti gli altri riportavano un punteggio polmonare ottimale: si potrebbe quindi affermare che una ventilazione insufficiente non determina necessariamente una maggiore prevalenza di patologie polmonari, ma incide sul benessere animale e sulla produttività in altri modi, come ad esempio favorendo la comparsa di stress termico, di imbrattamento dei capi e di cannibalismo a coda e orecchie (Telkänranta et al., 2014).
Anche le lesioni pleuriche non sembrano essere strettamente correlate ad una scarsa qualità dell'aria, in quanto il punteggio pleurico peggiore era stato ottenuto da uno degli unici due allevamenti in cui il sistema di ventilazione era risultato privo di carenze (ABF 10). Uno studio precedente svolto in Belgio sui suini al macello (Meyns et al., 2011) aveva evidenziato come i fattori di rischio associati ad una più alta prevalenza di lesioni da polmonite fossero la presenza di pleurite e l'acquisto frequente di animali. Tali osservazioni non trovano riscontro in questo studio, in quanto polmoniti e pleuriti non mostrano correlazione ed anzi, l'unica azienda con polmoniti sopra la media nazionale

(ABF 7), aveva anche la minore prevalenza di pleuriti; mentre entrambe le aziende con un punteggio di biosicurezza esterna alla voce “acquisto di animali e seme” sotto la media nazionale e globale (ABF 5 e ABF 9) avevano un punteggio polmonare buono.

Scrofe in gabbia

Le dimensioni delle gabbie per scrofe in gestazione/parto sono risultate insufficienti (CRPA, 2018) in 2 allevamenti su 3 da riproduzione (ABF 2 e ABF 3) ed entrambi hanno mostrato una prevalenza relativamente alta di stereotipie orali nelle scrofe stesse.
2 aziende su 3 (ABF 1 e ABF 2) hanno presentato lesioni da strutture sulle scrofe, suggerendo la necessità di migliorare non solo le dimensioni ma anche il management delle gabbie, eliminando asperità e superfici taglienti. Inoltre, sarebbe opportuno stabilire un metodo per distinguere, nelle scrofe, le lesioni da strutture da quelle che potrebbero essere una conseguenza di dolori all’apparato muscoloscheletrico, soprattutto nelle aziende in cui si rileva la presenza di zoppie tra le scrofe in box.
Di seguito sono riportati i grafici 3 e 4. Nel grafico 3 vengono rappresentate le tipologie di lesioni al macello rilevate e confrontate con la media nazionale. L’azienda ABF 1 non viene riportata, in quanto non aveva un settore ingrasso ed i suini venivano ingrassati negli allevamenti ABF 4 e ABF 7. Nel grafico 4 sono riportati i punteggi biosicurezza calcolati per ciascuna azienda col sistema Biocheck.UGent.

Grafico 3: Lesioni rilevate al macello
Graphic 3: Lesions identified at the slaughterhouse

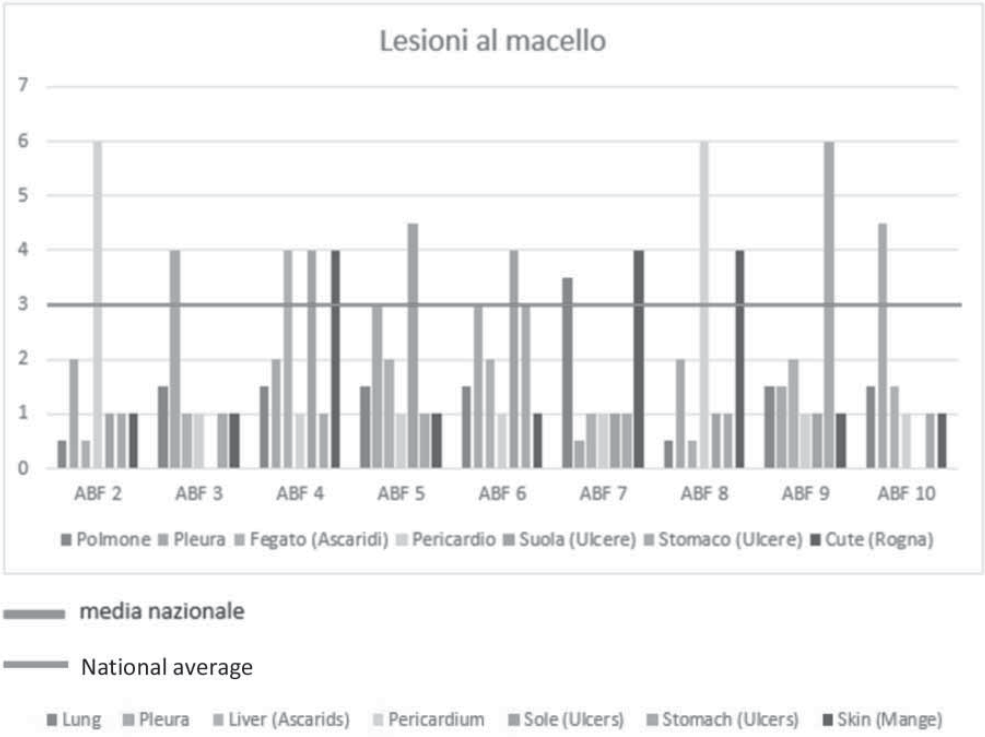
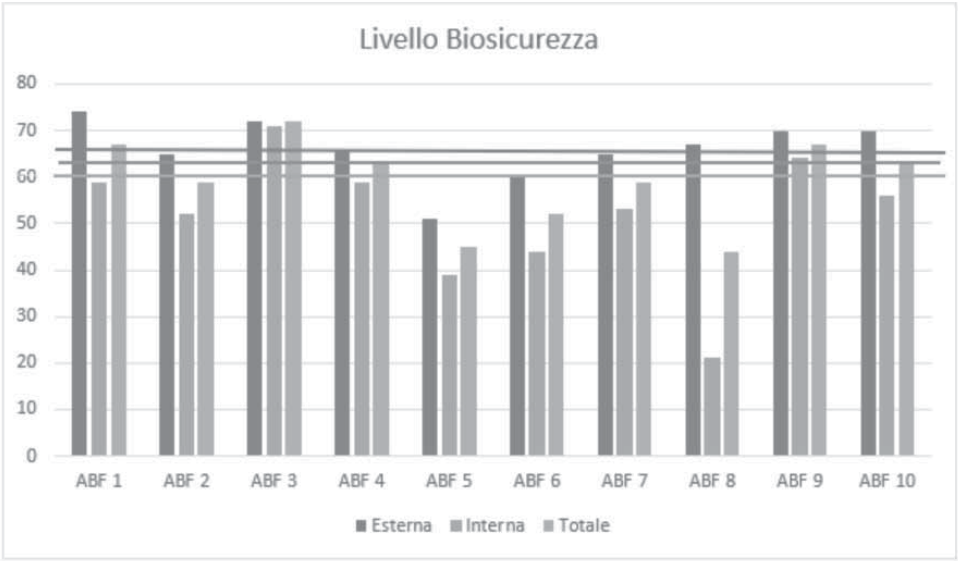


Grafico 4: Livello di biosicurezza
Graphic 4: Biosecurity level



Media nazionale biosicurezza totale
Media nazionale biosicurezza esterna
Media nazionale biosicurezza interna

External Internal Total

National average total biosecurity
National average external biosecurity
National average internal biosecurity

Nessuna azienda è risultata al di sotto della media nazionale per tutte le tipologie di lesioni considerate e ciò conferma l'esistenza di un margine di miglioramento per tutti gli allevamenti presi in esame.
Oltre alle ulcere soleari, le lesioni che più frequentemente in questo studio superavano la soglia di positività erano le lesioni da rogna sarcoptica.
In generale si può notare un maggiore livello di biosicurezza esterna che interna, sia tra gli allevamenti del presente studio sia tra le medie nazionali e globali, tendenza che viene segnalata in diversi studi (Pandolfi et al., 2018).
Nel presente studio non c'è una correlazione significativa tra un maggior livello di biosicurezza interna ed un maggior punteggio IBA ed i risultati sono variabili.
Tuttavia, visto il campione limitato di allevamenti presi in esame nel progetto, tale considerazione necessita di essere verificata su un numero maggiore di aziende.
È stata individuata invece una tendenza ($p=0.10$) tra le misure indirette di valutazione dell'IBA e la biosicurezza interna: questa era una possibile correlazione attesa, in quanto

strutture gestite meglio si traducono in una migliore biosicurezza interna; similmente, è stato osservato in uno studio (Laanen et al., 2013) come i punteggi di biosicurezza interna fossero complessivamente migliori in allevamenti dotati di strutture più moderne.
Inoltre, i punteggi IBA totali correlano positivamente con i punteggi IBA per le misure dirette, ma non con quelli per le misure indirette, nonostante le misure indirette considerate nelle checklist IBA siano molto più numerose di quelle dirette (312 contro 28): questo significa che nel sistema IBA 2.0 gli animal criteria sono considerati aspetti più importanti nel determinare il benessere animale, rispetto ai design criteria e ciò si pone a conferma dell'appropriatezza del metodo IBA per la valutazione del benessere degli animali.

CONCLUSIONI

La presente ricerca era finalizzata a un'indagine sulle condizioni di benessere dei suini pesanti destinati alla produzione di prosciutti a marchio DOP, in un campione di allevamenti emiliano romagnoli, attraverso l'applicazione del protocollo di valutazione IBA 2.0, elaborato dal CRPA di Reggio Emilia, per mettere in evidenza i punti critici e i punti di forza di tale produzione.
La classe media di benessere degli allevamenti presi in esame è risultata essere 4-DISCRETO.
Le criticità strutturali riscontrate più frequentemente erano l'insufficiente numero di abbeveratoi, le carenze di ventilazione, la lunghezza insufficiente dei trogoli.
Le criticità gestionali si concentravano soprattutto sull'assenza di arricchimento ambientale.
Le misure dirette sugli animali hanno evidenziato, nel settore riproduzione, criticità relative principalmente a lesioni da strutture e stereotipie orali nelle scrofe in gabbia parto/gestazione.
Nel settore ingrasso, la maggiore criticità evidenziata attraverso le misure dirette, era il livello di sporcizia degli animali, probabilmente associato più ad un problema di densità eccessiva (che comunque nella maggior parte dei casi rispettava i minimi requisiti di legge) che ad uno scarso livello di biosicurezza interna.
Non è stata evidenziata una correlazione sistematica tra più alti livelli di biosicurezza e maggior livello di benessere. È stata individuata invece una tendenziale correlazione ($p=0.10$) tra le misure indirette di valutazione dell'IBA e la biosicurezza interna: questa era una possibile correlazione attesa, in quanto strutture gestite meglio si traducono in una migliore biosicurezza interna.
Inoltre, è stata individuata una correlazione positiva tra i punteggi IBA totali e i punteggi IBA per le misure dirette, mentre lo stesso non vale per le misure indirette: anche questa poteva essere una correlazione attesa, in quanto nell'ultimo decennio è emerso come gli animal criteria siano più importanti dei design criteria nel valutare il benessere animale. Il sistema IBA 2.0 è quindi un metodo adeguato per la valutazione del welfare.
Tra le lesioni rilevate sugli animali al macello, l'elevata prevalenza di ulcere soleari gravi suggerisce la necessità di indagare se le misure del fessurato previste per i suini da ingrasso siano adatte anche per il suino macellato a 170 kg. Nessuna azienda è risultata al di sotto della media nazionale per tutte le tipologie di lesioni considerate e ciò conferma l'esistenza di un margine di miglioramento per tutti gli allevamenti presi in esame. Esiste un numero molto esiguo di studi riguardo il benessere del suino pesante italiano e molti aspetti non sono ancora stati analizzati.
Le evidenze raccolte e riportate in questa trattazione costituiscono una fotografia del livello di benessere del suino pesante allevato in Emilia. Tale fotografia, oltre ad avere uno scopo informativo, potrebbe fornire uno spunto di partenza per promuovere il miglioramento del welfare del suino pesante, per il quale non esistono requisiti specifici e che potrebbe presentare fabbisogni, in termini di protezione, diversi dai conspecifici "leggeri" allevati nel

resto dell'Europa. Aumentare l'attenzione nei confronti del benessere del suino pesante è importante non solo per motivi etici, ma anche per soddisfare le aspettative del consumatore nei confronti dei marchi DOP e IGP e per aumentare il valore di tali certificazioni. Inoltre, considerato che altri Paesi Europei hanno aumentato il peso di macellazione dei suini negli ultimi decenni per diluire i costi fissi, indagare la condizione di welfare del suino pesante italiano potrebbe risultare utile anche in altri contesti produttivi (Vitali et al., 2021).

BIBLIOGRAFIA

1. Alonso, Marta E., José R. González-Montaña, e Juan M. Lomillos. «Consumers' Concerns and Perceptions of Farm Animal Welfare». Animals 10, n. 3 (27 febbraio 2020): 385. https://doi.org/10.3390/ani10030385.
2. Birch, Jonathan, Alexandra K. Schnell, e Nicola S. Clayton. «Dimensions of Animal Consciousness». Trends in Cognitive Sciences 24, n. 10 (ottobre 2020): 789–801. https://doi.org/10.1016/j.tics.2020.07.007.
3. Blokhuis, Harry J., Linda J. Keeling, Andrea Gavinelli, e Jordi Serratosa. «Animal Welfare's Impact on the Food Chain». Trends in Food Science & Technology 19 (novembre 2008): S79–87. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2008.09.007.
4. Brambell, F. W. «Report of the Technical Committee to Enquire into the Welfare of Animals Kept under Intensive Livestock Husbandry Systems». Undefined, 1965. https://www.semanticscholar.org/paper/Report-of-the-technical-committee-to-enquire-into-Brambell/5a3cc31a6a6cb03dff6df97072d25a90860dcf5c.
5. Broom, Donald M. «Animal Welfare: An Aspect of Care, Sustainability, and Food Quality Required by the Public». Journal of Veterinary Medical Education 37, n. 1 (marzo 2010): 83–88. https://doi.org/10.3138/jvme.37.1.83.
6. Cargill Colin F., Andrew M. Pointon, Peter R. Davies, Roberto Garcia, «Using slaughter inspections to evaluate sarcoptic mange infestation of finishing swine». Veterinary Parasitology Volume 70, Issues 1–3, June 1997, Pages 191-200
7. Ceccarelli, Margherita, Elisa Leprini, Paola Sechi, Maria Francesca Iulietto, Luca Grispoldi, Enzo Goretti, e Beniamino Terzo Cenci-Goga. «Analysis of the Causes of the Seizure and Destruction of Carcasses and Organs in a Slaughterhouse in Central Italy in the 2010-2016 Period». Italian Journal of Food Safety 7, n. 1 (31 marzo 2018). https://doi.org/10.4081/ijfs.2018.6899.
8. Chantziaras, Ilias, Jeroen Dewulf, Tommy Van Limbergen, Tomasz Stadejek, Jarkko Niemi, Ilias Kyriazakis, e Dominiek Maes. «Biosecurity Levels of Pig Fattening Farms from Four EU Countries and Links with the Farm Characteristics». Livestock Science 237 (1 luglio 2020): 104037 . https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104037.
9. Cornish, Amelia, David Raubenheimer, e Paul McGreevy. «What We Know about the Public's Level of Concern for Farm Animal Welfare in Food Production in Developed Countries». Animals 6, n. 11 (16 novembre 2016): 74 . https://doi.org/10.3390/ani6110074.
10. Cox, Janice, e Jessica Bridgers. «Why Is Animal Welfare Important for Sustainable Consumption and Production?», s.d., 14.
11. Davies, Peter R. «Sarcoptic mange and production performance of swine: A review of the literature and studies of associations between mite infestation, growth rate and measures of mange severity in growing pigs ». Veterinary Parasitology Volume 60, Issues 3–4, December 1995, Pages 249-264
12. CRPA, 2018, Il benessere dei suini in allevamento -indicazioni pratiche (http://www.crpa.it/media/documents/crpa_www/Progetti/benessere_suini/IL_BENESSERE_DEI_SUINI_IN_ALLEVAMENTO.pdf)

13. De Luca, Silvio, Emanuela Zanardi, Giovanni Loris Alborali, Adriana Ianieri, e Sergio Ghidini. «Abattoir-Based Measures to Assess Swine Welfare: Analysis of the Methods Adopted in European Slaughterhouses». Animals : an Open Access Journal from MDPI 11, n. 1 (18 gennaio 2021): 226. https://doi.org/10.3390/ani11010226.
14. Di Pasquale, Jorgelina, Eleonora Nannoni, Isabella Del Duca, Felice Adinolfi, Fabian Capitanio, Luca Sardi, Marika Vitali, e Giovanna Martelli. «What Foods Are Identified as Animal-friendly by Italian Consumers?» Italian Journal of Animal Science 13, n. 4 (gennaio 2014): 3582. https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3582.
15. 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.
16. European Commission (EC), 2005. Attitudes of consumers towards the welfare of farmed animals. Special Eurobarometer, 229, Wave 63.2 Available at: https://europa.eu/euro-barometer/surveys/detail/450
17. European Commission (EC), 2016. Attitudes of s Towards Animal Welfare.
18. Special Eurobarometer, 442, Wave EB84.4. Available at: https://europa.
19. eu/eurobarometer/surveys/detail/2096
20. Gastaldo, Borciani «La valutazione del benessere dei suini in allevamento», Professione Suinicoltore, Settembre 2017
21. Gillman, C. E., A. L. KilBride, P. Ossent, e L. E. Green. «A Cross-Sectional Study of the Prevalence and Associated Risk Factors for Bursitis in Weaner, Grower and Finisher Pigs from 93 Commercial Farms in England». Preventive Veterinary Medicine 83, n. 3 (17 marzo 2008): 308–22. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2007.09.001.
22. Gonzalez-Rivas, Paula A., Surinder S. Chauhan, Minh Ha, Narelle Fegan, Frank R. Dunshea, e Robyn D. Warner. «Effects of Heat Stress on Animal Physiology, Metabolism, and Meat Quality: A Review». Meat Science 162 (1 aprile 2020): 108025. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2019.108025.
23. Gottardo, F., A. Scollo, B. Contiero, M. Bottacini, C. Mazzoni, e S.A. Edwards. «Prevalence and Risk Factors for Gastric Ulceration in Pigs Slaughtered at 170 Kg». Animal 11, n. 11 (2017): 2010–18. https://doi.org/10.1017/S1751731117000799.
24. Grandin, Temple. «The Economic Benefits of Proper Animal Welfare», s.d., 6. Reciprocal Meat Conference Proceedings, Volume 48,. 1995
25. Gross, Sabine, Megan E. Waldrop, e Jutta Roosen. «How Does Animal Welfare Taste? Combining Sensory and Choice Experiments to Evaluate Willingness to Pay for Animal Welfare Pork». Food Quality and Preference 87 (gennaio 2021): 104055. https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2020.104055.
26. Harnad, Stevan. «Animal Sentience: The Other-Minds Problem». Animal Sentience 1, n. 1 (1 gennaio 2016). https://doi.org/10.51291/2377-7478.1065.
27. Harrison, R. Animal Machines: The New Factory Farming Industry; Vincent Stuart Ltd.: London, UK, 1964.
28. Jørgensen, B. «Influence of Floor Type and Stocking Density on Leg Weakness, Osteochondrosis and Claw Disorders in Slaughter Pigs». Animal Science 77, n. 3 (dicembre 2003): 439–49. https://doi.org/10.1017/S1357729800054382.
29. Kongsted, H., e J.T. Sørensen. «Lesions Found at Routine Meat Inspection on Finishing Pigs Are Associated with Production System». The Veterinary Journal 223 (maggio 2017): 21–26. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.016.
30. Laanen, M., D. Persoons, S. Ribbens, E. de Jong, B. Callens, M. Strubbe, D. Maes, e J. Dewulf. «Relationship between Biosecurity and Production/Antimicrobial Treatment

Characteristics in Pig Herds». Veterinary Journal (London, England: 1997) 198, n. 2 (novembre 2013): 508–12. https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.08.029.
31. Madec, F., Derrien, H., 1981. «Fréquence, intensité et localization des lesions pulmonaires chez le porc charcutier: Résultats d'une première série d'observations en abattoir». Journées de la Recherche Porcine en France 13, 231-236.
32. Maes, Dominiek, Filip Boyen, Bert Devriendt, Peter Kuhnert, Artur Summerfield, e Freddy Haesebrouck. «Perspectives for improvement of Mycoplasma hyopneumoniae vaccines in pigs». Veterinary Research 52, n. 1 (8 maggio 2021): 67. https://doi.org/10.1186/s13567-021-00941-x.
33. Mellor, David. «Updating Animal Welfare Thinking: Moving beyond the "Five Freedoms" towards "A Life Worth Living"». Animals 6, n. 3 (14 marzo 2016): 21. https://doi.org/10.3390/ani6030021.
34. Meyns, Tom, Jan Van Steelant, Emily Rolly, Jeroen Dewulf, Freddy Haesebrouck, e Dominiek Maes. «A Cross-Sectional Study of Risk Factors Associated with Pulmonary Lesions in Pigs at Slaughter». The Veterinary Journal 187, n. 3 (1 marzo 2011): 388–92. https://doi.org/10.106/j.tvjl.2009.12.027.
35. Ministero della salute, Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020 (10 novembre 1017): 80. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf
36. Nannoni E, Martelli G, Rubini G, Sardi L (2019) Effects of increased space allowance on animal welfare, meat and ham quality of heavy pigs slaughtered at 160Kg. PLoS ONE 14(2): e0212417. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212417
37. Nannoni, Eleonora, André J. A. Aarnink, Herman M. Vermeer, Inonge Reimert, Michaela Fels, e Marc B. M. Bracke. «Soiling of Pig Pens: A Review of Eliminative Behaviour». Animals 10, n. 11 (novembre 2020): 2025. https://doi.org/10.3390/ani10112025.
38. Nielsen, Søren S, Gitte B Nielsen, Matthew J Denwood, John Haugegaard, e Hans Houe. «Comparison of Recording of Pericarditis and Lung Disorders at Routine Meat Inspection with Findings at Systematic Health Monitoring in Danish Finisher Pigs». Acta Veterinaria Scandinavica 57, n. 1 (dicembre 2015): 18. https://doi.org/10.1186/s13028-015-0109-z.
39. Pandolfi, Fanny, Sandra A. Edwards, Dominiek Maes, e Ilias Kyriazakis. «Connecting Different Data Sources to Assess the Interconnections between Biosecurity, Health, Welfare, and Performance in Commercial Pig Farms in Great Britain». Frontiers in Veterinary Science 5 (2018): 41. https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00041.
40. Pasipanodya, Calvin Ngonidzashe, Trevor Tinashe Tekedza, Fungayi Primrose Chatiza, e Eddington Gororo. «Efficacy of Neem (Azadirachta Indica) Aqueous Fruit Extracts against Sarcoptes Scabiei Var. Suis in Grower Pigs». Tropical Animal Health and Production 53, n. 1 (22 gennaio 2021): 135. https://doi.org/10.1007/s11250-020-02545-7.
41. Postma, M., A. Backhans, L. Collineau, S. Loesken, M. Sjölund, C. Belloc, U. Emanuelson, E. Grosse Beilage, K.D.C. Stärk, e J. Dewulf. «The Biosecurity Status and Its Associations with Production and Management Characteristics in Farrow-to-Finish Pig Herds». Animal 10, n. 3 (2016): 478–89. https://doi.org/10.1017/S1751731115002487.
42. Ross, J. W., B. J. Hale, N. K. Gabler, R. P. Rhoads, A. F. Keating, L. H. Baumgard, J. W. Ross, et al. «Physiological Consequences of Heat Stress in Pigs». Animal Production Science 55, n. 12 (21 ottobre 2015): 1381–90. https://doi.org/10.1071/AN15267.
43. Rubini, Giulia, Eleonora Nannoni, Jorgelina Di Pasquale, Giovanna Martelli, e Luca Sardi. «Update on animal welfare perception by Italian consumers: A descriptive survey». Italian Journal of Food Safety 10, n. 3 (29 settembre 2021): 9588. https://doi.org/10.4081/ijfs.2021.9588.

44. Scollo, Annalisa, Flaviana Gottardo, Barbara Contiero, Claudio Mazzoni, Philippe Leneveu, e Sandra A. Edwards. «Benchmarking of Pluck Lesions at Slaughter as a Health Monitoring Tool for Pigs Slaughtered at 170kg (Heavy Pigs)». Preventive Veterinary Medicine 144 (1 settembre 2017): 20–28. https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.007.
45. Sinclair, Michelle, Claire Fryer, e Clive Phillips. «The Benefits of Improving Animal Welfare from the Perspective of Livestock Stakeholders across Asia». Animals 9, n. 4 (28 marzo 2019): 123. https://doi.org/10.3390/ani9040123.
46. Stygar, A.H., I. Chantziaras, I. Toppari, D. Maes, e J.K. Niemi. «High Biosecurity and Welfare Standards in Fattening Pig Farms Are Associated with Reduced Antimicrobial Use». Animal 14, n. 10 (2020): 2178–86. https://doi.org/10.1017/S1751731120000828.
47. Suivet comunicazione personale (1/10/2018)
48. Telkänranta, Helena, Marc B.M. Bracke, e Anna Valros. «Fresh Wood Reduces Tail and Ear Biting and Increases Exploratory Behaviour in Finishing Pigs». Applied Animal Behaviour Science 161 (dicembre 2014): 51–59. https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.09.007.
49. Tsakiridou, Efthimia, Helen Tsakiridou, Konstadinos Mattas, e Evdoxia Arvaniti. «Effects of Animal Welfare Standards on Consumers' Food Choices». Food Economics - Acta Agriculturae Scandinavica, Section C 7, n. 2–4 (giugno 2010): 234–44. https://doi.org/10.1080/16507541.2010.531949.
50. Vecerek, Vladimir, Eva Voslarova, Zbynek Semerad, e Annamaria Passantino. «The Health and Welfare of Pigs from the Perspective of Post Mortem Findings in Slaughterhouses». Animals 10, n. 5 (maggio 2020): 825. https://doi.org/10.3390/ani10050825.
51. Vitali, Marika, Eleonora Nannoni, Luca Sardi, e Giovanna Martelli. «Knowledge and Perspectives on the Welfare of Italian Heavy Pigs on Farms». Animals 11, n. 6 (6 giugno 2021): 1690. https://doi.org/10.3390/ani11061690.
52. Wemelsfelder, F. «Qualitative Behaviour Assessment (QBA): A Novel Method for Assessing Animal Experience». Proceedings of the British Society of Animal Science 2008 (ed 2008): 279–279. https://doi.org/10.1017/S1752756200028246.
53. Wigham, Eleanor E., Andy Butterworth, e Steve Wotton. «Assessing Cattle Welfare at Slaughter – Why Is It Important and What Challenges Are Faced?» Meat Science 145 (novembre 2018): 171–77. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.06.010.

SITOGRAFIA

«ClassyFarm – Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna». Consultato 3 ottobre 2021. https://www.classyfarm.it/.

«ECI 'End the Cage Age'». Consultato 29 settembre 2021. https://ec.europa.eu/food/animals/animal-welfare/eci-end-cage-age_en.

https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/268

Goi. «Antibiotic-free». Antibiotic-free. Consultato 10 ottobre 2021. http://goi.crpa.it/nqcontent.cfm?a_id=18720&tt=t_bt_app1_www.

OIE - World Organisation for Animal Health. «Animal Welfare». Consultato 3 ottobre 2021. https://www.oie.int/en/what-we-do/animal-health-and-welfare/animal-welfare/.

«The Origins & History of the RSPCA | RSPCA». Consultato 28 settembre 2021. https://www.rspca.org.uk/whatwedo/whoweare/history.

«Welfare Quality Network | Home». Consultato 3 ottobre 2021. http://www.welfarequality.net/en-us/home/.

APPENDICE NORMATIVA

Dir. 98/58/CE (https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0058&from=IT)
d.lgs. 146/2001 (https://www.camera.it/parlam/leggi/deleghe/01146dl.htm)
d.lgs. 122/2011
(https://www.gazzettaufficiale.it/atto/serie_generale/caricaDettaglioAtto/originario?atto.dataPubblicazioneGazzetta=2011-08-02&atto.codiceRedazionale=011G0164&elenco30giorni=false)

Ministero della Salute. Adempimenti in Materia di Benessere Animale di Cui al d.Lgs. 122/2011 Sulla Protezione dei Suini in Allevamento; Nota Ministeriale 0005732-04/03/2021-DGSAF-MDS-P; Ministero della Salute: Rome, Italy, 2021.

Ministero della Salute. Introduzione di Suini a Coda Integra da Allevamenti da Riproduzione Italiani e Provenienti da Paesi UE e Rispetto Delle Disposizioni Previste dal d.Lgs. 122/2011 e Relativo Piano Nazionale; Nota Ministeriale 0014898-03/07/2020-DGSAF-MDS-P; Ministero della Salute: Rome, Italy, 2020

VALUTAZIONE DEL CARICO ALLOSTATICO NELLE SCROFE PRE-PARTO

EVALUATION OF THE ALLOSTATIC LOAD IN SOWS PRE-DELIVERY

QUAI F.[1], MAZZONI C.[2], COTTICELLI A.[1], PERIC T.[1]

[1]*Università degli studi di Udine, Dipartimento di scienze Agroalimentari, Ambientali e Animali, Udine, Italia;*
[2]*Swivet Research, Reggio Emilia, Italia*

Parole chiave: Scrofe – Cortisolo – Gravidanza
Keywords: Sows – Cortisol – Pregnancy

RIASSUNTO
L'obiettivo di questo studio era quello di valutare il carico allostatico e l'effetto dell'ambiente su di esso nel preparto delle scrofe. Le informazioni ottenute potrebbero risultare utili per migliorare la gestione degli animali e, quindi, il loro benessere. Infatti, negli allevamenti intensivi gli *stressors* sono per la gran parte attribuibili alle condizioni ambientali in cui vivono gli animali e alle pratiche di gestione usate.
Lo studio è stato condotto su 296 scrofe gravide; le scrofe sono state allevate in un allevamento specializzato per la produzione del Prosciutto di Parma secondo il circuito DOP, in provincia di Brescia.
Per ottenere informazioni sullo stato ormonale della scrofa durante tutta la gravidanza è stato utilizzato un campione biologico retrospettivo di medio-lungo termine come lo è la matrice tricologica. Il prelievo del pelo è stato effettuato sul dorso; ogni campione è stato prelevato 2.6 ± 1.6 (media ± ES) giorni prima della data del parto prevista e complessivamente tutti i campioni sono stati prelevati tra febbraio e giugno. Pertanto, ogni animale poteva cadere nelle bande di febbraio, marzo, aprile, maggio o giugno. Le concentrazioni di cortisolo nel pelo sono state determinate utilizzando un radioimmunosaggio (RIA).
I risultati hanno mostrato una differenza statisticamente significativa nelle concentrazioni di cortisolo nel pelo (HC) tra quelle ottenute per i mesi di febbraio e marzo e quelle di aprile, maggio e giugno ($P < 0,001$); infatti, le concentrazioni di HC hanno continuato ad aumentare dall'inizio dello studio raggiungendo le loro concentrazioni più alte nel mese di giugno. Allo stesso tempo, il *Temperature Humidity Index* (THI) medio mensile è passato da un minimo di 43.01 a un valore di 73.48 raggiunto a giugno.
Considerando che l'intera gestione è stata mantenuta inalterata durante lo studio e per tutte le bande, l'unico cambiamento ambientale registrato è stato il THI. Pertanto, l'aumento delle concentrazioni di HC, biomarker del carico allostatico, sembra essere legato all'aumento del THI. Inoltre, i risultati sembrano suggerire che durante il processo di allevamento agisca un effetto aggregato di diversi fattori di stress che in questo studio sono stati esacerbati quando è stato registrato un THI più elevato.
Risulta, quindi, strategico assicurare condizioni di termoneutralità al fine di prevenire l'annullamento dei benefici apportati da tutte le strategie che vengono utilizzate per garantire e migliorare il benessere animale in allevamento.

ABSTRACT
The aim of the study was to evaluate the allostatic load and the effect of the environment on it in the pre-partum of sows. The information obtained could be useful to improve the

management of the animals and therefore their welfare. In fact, in intensive farms the *stressors* are mostly attributable to the environmental conditions in which the animals live, and the management practices used.
The study was conducted on 296 pregnant sows; the sows were raised in a specialized farm for the production of Parma ham in according to PDO in the province of Brescia, Po Valley (Italy).
To obtain information on the hormonal status of the sow throughout the pregnancy it was used a medium-long term retrospective biological sample as hair is. The hair sampling was carried out on the back; each sample was taken 2.6 ± 1.6 (mean ± SE) days before the expected delivery date and overall all samples were taken between February and June. Thus, each animal could fall in the February, March, April, May, or June batch. The hair cortisol concentrations were determined using a solid-phase microtiter RIA assay.
The results showed a statistically significant difference in HC concentrations between those obtained for February and March and those of April, May and June ($P < 0.001$); in fact, the HC concentrations continue to rise from the beginning of the study reaching their highest concentrations in June. At the same time, the average monthly Temperature Humidity Index (THI) moved from a minimum of 43.01 to a value of 73.48 reached in June.
Considering that the entire management was kept unchanged during the trail and for all the batches, the only environmental change recorded was the THI. Therefore, the increase in HC concentrations, the biomarker of the allostatic load, seems to be linked to the increase in THI. Moreover, the results seem likely to suggest that during the rearing process act an aggregate effect of different *stressors* that in this study were exacerbated when a higher THI has been recorded.
Thus, it is strategic to assure conditions of thermoneutrality in order to prevent the nullification of the benefits brought by all the strategies that are used to guarantee and improve the on-farm animal welfare.

1. INTRODUCTION

1.1. Animal welfare concepts

Animal welfare is a subject of increasing interest and public debate. This growing interest has led different countries to reconsider the current legislation on animal welfare to provide the best possible management (Korte et al. 2007; Marchant Forde, 2019). This largely derives from the fact that the market demand has led to the development of increasingly intensive farming systems, which due to their characteristics are in contrast with the ethics of many consumers (Špinka, 2017; Marchant Forde, 2019). It is therefore clear that we must first understand the meaning of the term "welfare". Animal welfare was defined as: "*the state of an animal as it attempts to cope with the environment*" (Webster, 2011), which in the case of farm animals becomes: "*the state of body and mind of a sentient animal as it attempts to cope with its environment*" (Broom & Johnson, 2019).
Welfare is a very broad concept and is connected to the concept of stress, in fact, they are both terms related to adaptive processes. When adaptation is possible without too much effort (in terms of energy cost) then well-being is safeguarded; on the other hand, if the adaptation is inadequate then the organism finds itself in the inability to cope with the stressful situation with a reduction in welfare (Veissier & Boissy, 2007; Colditz & Hine, 2016)

1.2. Sustainability concept

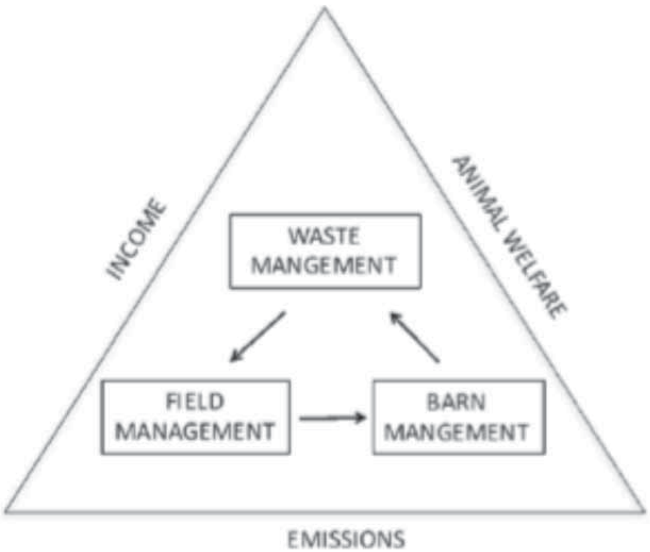
For animal production, as well as for other production systems, sustainability is important.

On the other hand it is not easy to define sustainability because it has different meanings and takes into consideration various factors, among which there is also the ethics of the production system (Galioto *et al.*, 2017; Broom & Johnson, 2019). A definition of sustainability is: *"a system or procedure is sustainable if it is acceptable now and if its expected future effects are acceptable, in particular in relation to resource availability, consequences of functioning and morality of action"* (Broom & Johnson, 2019)
Animal welfare is considered as one of the indispensable factors for the sustainability of animal production (Broom, 2010). In fact, in farms the concept of sustainability is divided into 4 different concepts:

- economic sustainability (profitability);
- internal social sustainability (working conditions);
- external social sustainability (animal welfare, landscape quality, etc.);
- ecological and environmental sustainability (GHG emissions, eutrophication, groundwater pollution, etc.) (Galioto *et al.*, 2017).

We can therefore consider the production process of livestock farms divided into 3 phases: field phase (involving field practices), barn phase (which concerns breeding practices) and waste management phase (management of livestock waste), which are not independent from each other but whose management influences the performance of the others in terms of: profitability, animal welfare, and emissions (Galioto *et al.*, 2017).

Figure 1- The nexus between the three production phases in livestock farms (Galioto et al. 2017).
Figura 1 - Il nesso tra le tre fasi produttive negli allevamenti (Galioto et al. 2017).



1.3. Effects of distress on the production process on farms

Considering that animal welfare refers to both the health and psychological state (Buller *et al.*, 2018), in intensive farms the *stressors* are mostly attributable to the environmental conditions in which the animals and the management practices used (Albernaz-Gonçalves *et al*. 2021). In fact some of the most frequent *stressors* in pig farms are: confinement, high temperatures, chronic hunger, painful mutilations, early weaning, high stocking density and subsequent social grouping (Velarde *et al.,* 2015; Albernaz-Gonçalves *et al.* 2021). All these

stressors cause a reduction in animal welfare and this reduction in welfare is related to the following aspects:

- immunosuppression;
- reduced weight, growth, and body condition;
- reduced reproductive success;
- increased frequency of abnormal and stereotypic behaviours (Broom & Johnson, 2019).

In the following chapters we take into consideration the different aspects.

1.3.1. Immunosuppression

When animals are found in chronic stress, their immune systems are compromised and therefore this impairment of the immune system resulting in greater susceptibility to diseases (Broom & Johnson, 2019; Albernaz-Gonçalves et al. 2021). Many studies have in fact shown both in humans and in animals, how a chronic activation of the HPA (Hypothalamic-Pituitary- Adrenal) axis induces immunosuppression (Broom & Johnson, 2019). This is because with the activation of the HPA axis there is the production of cortisol, which with prolonged *stressors* causes the reduction of lymphocytes, cytokines, and immunoglobulins (Martínez-Miró *et al.*, 2016) environmental, metabolic, immunological and due to human handling.

In farms, therefore, to maintain health and productivity and prevent the spread of diseases, the use of antimicrobials is used (Albernaz-Gonçalves et al. 2021). The use of antimicrobials on farms (including antibiotics, antivirals, antifungals and antiparasitics) is widespread and has been found to be the major contributor to the problem of antimicrobial resistance (Broom & Johnson, 2019).

1.3.2. Reduced weight, growth and body condition

One of the first signs of reduced animal welfare is a reduction in the growth of growing animals or a reduction in weight in adults. With the activation of the HPA axis and the production of glucocorticoids there is an increase in catabolism with degradation of glycogen, adipose tissue, and muscle tissue to allow the release of glucose necessary in the stressful situation since at the same time there was also a reduction of feed intake (Martínez-Miró *et al.*, 2016)environmental, metabolic, immunological and due to human handling. This metabolization of stored energy reserves leads to a change in body composition. A possible indicator of animal welfare is the use of Body Condition Score (Broom & Johnson, 2019). As also seen from the study by Pierozan et al. (2021)which were aged between 75 and 173 days, and were managed on an all-in all-out basis. The welfare indicators were evaluated once on each farm using the methodology of the Welfare Quality® assessment protocol for pigs. Multiple linear mixed models were used to assess the associations of welfare with FCR and DFI according to the production stage at which the pigs were evaluated on the farm. Key results: The welfare indicators with the highest average prevalence were frequency of coughing (35.7% animal performance (Feed Conversion Ratio) is reduced if there are conditions that cause a reduction in animal welfare.

1.3.3. Reduced reproductive success

The reproductive performance of farm animals can be predictive of a state of stress and therefore of a reduction in welfare (Broom & Johnson, 2019). This reduction of the HPG (Hypothalamic-Pituitary-Gonads) axis is due to the hyperactivity of the HPA axis, which with the production of glucocorticoids inhibited the release of LH (luteinizing hormone) from the pituitary and the secretion of estrogen and progesterone from the ovary (Martínez-Miró *et al.*, 2016)environmental, metabolic, immunological and due to human handling. This decline in fertility on farms results in a major economic loss.

1.3.4. Increased frequency of abnormal and stereotypic behaviours

In intensive farms, pigs are often housed in small environments (high stock density) which prevent them from exhibiting their natural behaviours and this leads to the development of anomalous and stereotyped behaviours (Broom & Johnson, 2019; Albernaz-Gonçalves et al. 2021).
These four aspects are the main factors related with pig production; in fact, with high levels of stress and poor welfare there are important effects on all of these. Another factor influenced by the stress level of the animals is the quality of the meat, with a higher incidence of PSE (pale, soft and exudative) and DFD (dark, firm, dry) (Martínez-Miró *et al.*, 2016)environmental, metabolic, immunological and due to human handling.

1.4. Promote health and welfare to improve animal resilience in farms

It is important to use strategies to improve the health and welfare of animals and consequently increase their resilience, that is their ability to deal with adverse events (European Commission, 2021). In fact, increasing the welfare reduces the risk of the presence of pathogens and therefore fewer pharmacological treatments will be made, limiting the onset of antimicrobial resistance ; furthermore, there is an improvement in the productive and reproductive performance of the animals (Broom & Johnson, 2019; European Commission, 2021). It improves the FCI (feed conversion index) and therefore there will be a better efficiency of use of food with a consequent greater growth rate of the growing animals (Martínez-Miró *et al.*, 2016; Broom & Johnson, 2019; Yuan et al. 2020)environmental, metabolic, immunological and due to human handling. It also improves ovarian function, with a consequent increase in the speed of reaching puberty in young animals and an improvement in fertility as well as in the reproductive success of adult ones (Moberg, 1985; Martínez-Miró *et al.*, 2016; Broom & Johnson, 2019)environmental, metabolic, immunological and due to human handling.

1.5. Pig farming in italy

The pig sector in Italy is an important component of the national agri-food system, both as regards the turnover of the agricultural phase alone (€ 3 billion in 2019), and as regards the value of processing (€ 8 billion in 2019). For about a decade the supply chain has been in crisis, in fact there has been a progressive decline in the number of companies present on national soil. Despite this, pig production has remained almost stable, showing a production concentration in the sector. This crisis is due to the increase in production costs and in particular to the increase in the prices of cereals and protein crops for the production of feed (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, 2011).
In Italy in 2019 there were 32.137 farms, for a total of 8.608.000 pigs reared. The average size of national farms is about 268 animals/farm, but in larger farms it reaches 1500 animals/farm (ISMEA, 2021). The distribution of farms and animals by production orientation is as follows (Table 1):

Tabella 1 - Distribuzione degli allevamenti e degli animali per tipologia di allevamento (ISMEA, 2021).
Table 1 *- Distribution of herds and animals for type of farming (ISMEA, 2021).*

Type of farming	**Herds**	**Animals**
Breeding		
- closed cycle	52 %	8 %
- open cycle	11 %	26 %
Fattening	36 %	66 %

In 2019, 11.4 million of animals were slaughtered, showing a slight decrease compared to 2018 (-0.4%). In 2020, due to the COVID19 emergency, a sharp decline in slaughtering was recorded (- 13%) (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestal, 2011).
National pig farming is focused on the production of heavy pig from industrial processing. In Italy the 90% of slaughtered pigs are consist of heavy pigs and the 80% of these will be destined for the protected circuit to produce hams and other PDO cured meats.In fact, Italy has a heritage of 21 PDO and 21 PGI products. Most of the pigs destined to produce PDO hams have been certified within the Prosciutto di Parma and San Daniele circuit. Indeed, in 2019 the turnover of the two hams was respectively € 720.9 million for Parma and € 313,0 million for San Daniele out of a total value of € 1,7 billion s for hams and cured meats of the protected circuit. (Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestal, 2011; ISMEA, 2021).
In 2019, imports from the pig sector reached a record value of € 2,4 billion. The 85 % of imports are represented by pigmeat (fresh, refrigerated, and frozen). Live animals are only the 3,5 % of the import value and are mainly intended for fattening. Exports, which in 2019 reached a value of 1.8 billion euros, mainly concern processed products (hams and cured meats) (ISMEA, 2021).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Ethics

Although hair sampling is non-invasive and it is not a troublesome procedure, the study was carried out in accordance with Directive 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

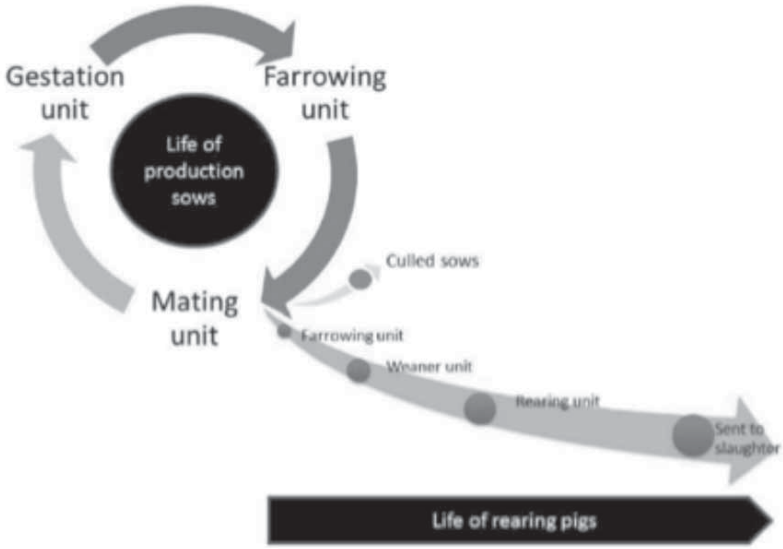
2.2. Animals

The study was conducted in the province of Brescia, Po Valley (Italy), at a site of about 2000 Danish sows (Dan Bred International®, Denmark) specialized in production for Parma ham according to PDO (Protected Designation of Origin). The animals at the farm are sows and piglets till weaning and the weaning time is once a week with piglets of 24 days of life on average. The study included 296 pregnant sows with a mean parity order of 4.40 ± 0.15 (mean ± SE). The gilts were excluded from the study because their behaviour in the delivery room is more unpredictable than the multiparous ones (Roelofs et al., 2019).

2.3. Housing conditions

Animals were reared according to the current Italian legislation which implements Council Directive 2008/120 EC, laying down minimum standards for the protection of pigs.
After mating, sows remain in the gestation cages for 28 days. Here the animals received ultrasound pregnancy detection and those positive were transferred to multiple pens of 10-15 sows where they remained until 5 days before farrowing. In reaching the farrowing rooms the sows were randomly housed in the farrowing cages, where they were housed on paper strips bedding during farrowing.
For all the sows included in the study only a spontaneous farrowing took place. During gestation the animals were fed with a liquid feeding through an automatic system. Nipple drinkers were available for make water available *ad libitum* to animals.
The management was organized in one week batch farrowing system and followed the standard operating procedures (SOPs) regarding vaccinations, placement, cleaning, waste management and biosecurity measures. The health status of the animals included in the study was considered “conventional”: *Mycoplasma hyopneumoniae* positive, Circovirus positive, PRRS (Porcine reproductive and respiratory syndrome) positive but stable-inactive at time of trial.

Figure 2 - Schematic general illustration of life of production sows and rearing pigs (from Marek Špinka, 2017).
Figura 2 - Illustrazione schematica generale della vita delle scrofe in riproduzione e dei suini da ingrasso (da Marek Špinka, 2017).



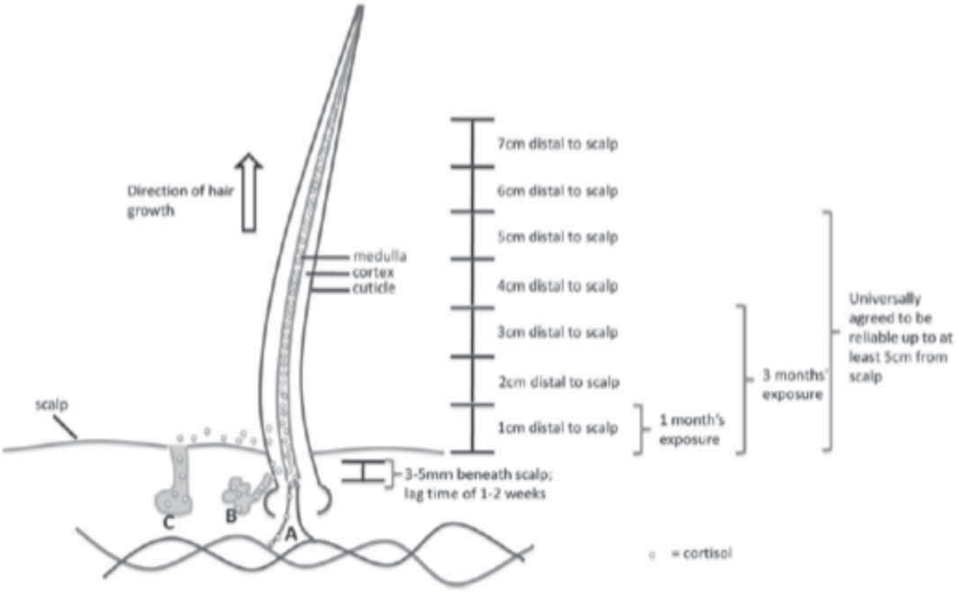
2.4. Environmental data
The environmental temperature and the relative humidity were recorded in collaboration with ARPA, Lombardia (Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Lombardia, Italy). A meteorological station that is recognized by the World Meteorological Organization regulations and located 15 km away from the farm provided the environmental data throughout the study; the station recorded the daily average for each factor. With these data the Temperature Humidity Index (THI) was calculated according to Mader's formula (2006):

$$THI = (0{,}8 \times T) + \left(\frac{RH}{100}\right) \times (T - 14{,}4) + 46{,}4$$

where T is the environmental temperature in °C and RH the relative humidity in %. Then, for all the data obtained the month average ± SE was calculated.

2.5. Hair sampling
The collection of the hair was carried out on the back at the level of the last rib and for about 10 cm at the side of the vertebral column; this area was chosen because of its cleanliness. The animal has been shaved as close as possible to the skin with a *Bosh* electric razor for large animals. Samples were then stored in paper envelops, in the dark at room temperature until analysis.
A sample was taken for each sow included in the experimental test, in relation to the expected date of farrowing. The sampling (mean ± SE: 2.6 ± 1.6 days before the expected delivery date) was done between the months of February and June, therefore each animal could fall in the February, March, April, May, or June batch.

Figure 3 - Mechanisms for incorporation of cortisol into hair via blood (A), sebum (B) and sweat (C) (Russell et al. 2012).
Figura 3 *- Meccanismi di incorporazione del cortisolo nel pelo tramite sangue (A), sebo (B) e sudore (C) (Russell et al. 2012).*



2.6. Washing procedure and extraction

In accordance with what described by Bergamin et al. (2019) the hair samples were previously washed before proceeding with the extraction. The hair samples were washed twice with 3 min/wash in 3 ml of isopropanol to minimize the risk of extracting steroids from the surface of the hair, which were deposited by sweat and sebum. Hair was than extracted according to the method described by Bergamin et al. (2019). In brief, approximately 60 mg of hair was put in a glass vial with 3 ml of methanol for the extraction and the vials were incubated at 37° C for 16 h. Next, the vial with the extract is placed under an airstream suction hood, where the liquid is evaporated to dryness at 37° C. The sample residues were dissolved in 0.8 ml of 0,05 M phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5).

2.7. Hormonal analysis

The hair cortisol concentrations were determined using a solid-phase microtiter RIA assay for pigs developed in house as described by Bergamin et al. (2019).
In brief, a 96-well microtiter plate (OptiPlate; PerkinElmer Life Sciences Inc.) was coated with goat anti-rabbit- γ globulin serum diluted 1:1000 in 0,15 mM sodium acetate buffer (pH 9) and incubated overnight at 4 °C. The plate was then washed twice with RIA buffer (pH 7.5) and incubated overnight at 4 °C with 200 µL of the antibody serum diluted at ratios of 1:20.000 (Analytical Antibodies, Bologna, Italy).
The cross-reactivities of the anti-cortisol antibody with other steroids were as follows:

- cortisol, 100%;
- corticosterone, 1.8%;
- aldosterone, < 0.02%.

After washing the plate with RIA buffer, the standards (5–200 pg/well), the quality-control extract, the test extracts and the RIA buffer were added, and the plate was incubated overnight at 4°C.
The decanting period allows the formation of the antigen-antibody bound which occurs with the same affinity for both the labeled and the unlabeled antigen. According to the law of mass action, the most concentrated antigen (both the labeled and the unlabeled one) will be the one that will occupy the most antibody sites (Kubasik, 1984).
The unbound antigen (labeled and unlabeled) constitutes the free fraction, while the bound antigen constitutes the bound fraction. The bound fraction is separated from the free fraction by washing the wells with RIA buffer. After the addition of 200 μL of scintillation cocktail, the plate was counted on a β counter.
The intra and inter-assay coefficients of variation for cortisol assay were 3.7% and 10.1%, respectively. The sensitivity of the assay for cortisol was 24.6 pg/ml.

2.8. Statistical analysis

The statistical analysis was performed with the R vers. 3.4.0. The normality of the data distribution was tested with the Shapiro-Wilk test. In case of non-normal distribution, the data has been transformed. The model adopted was a mixed model for repeated measures (Wang & Goonewardene, 2004) where the batch were considered between subject factors whereas the day of the sampling was considered as a repeated measure. The post hoc test was conducted according to Holm-Sidak.

2.9. Aim of the study

The objectives of this research were as following:

- to evaluate the allostatic load in the pre-partum of sows by the hair cortisol assessment;
- to assess the effect of environment on the allostatic load of pregnant sows.

3. RESULTS

Table 2 shows the monthly mean values of temperature and relative humidity that were detected during the study. The month average THI ranged between a minimum of 43.01 in the February batch and a maximum of 73.48 in the June batch.

Table 2 - Temperature, Relative humidity, and THI mean values from February to June.
Tabella 2 - Valori medi di temperatura, umidità relativa e THI da febbraio a giugno.

Batch	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	THI
February	5.32	91.77	43.09
March	4.68	87.22	41.86
April	14.00	82.35	57.15
May	20.75	76.74	67.81
June	25.03	66.17	73.48

As reported in Table 3 the April, May and June batches showed the highest hair cortisol (HC) concentration in comparison with those assessed for the February and March batches ($P < 0.01$).

Table 3 - Estimated marginal means (±SEM) of hair cortisol concentrations (pg/mg) recorded in sows (n=296). [a,b] Means within a column and within mean effect not sharing the same superscript differ at P<0.05.
Tabella 3 - Medie marginali stimate (±SEM) delle concentrazioni di cortisolo nel pelo (pg/mg) registrate nelle scrofe (n=296). [a,b] Le medie all'interno di una colonna e all'interno dell'effetto medio che non condividono lo stesso esponente differiscono per P<0,05.

Main effects	Cortisol
February	12.67[a]
March	9.31[a]
April	16.25[b]
May	27.83[b]
June	28.55[b]
SEM	*1.349*
P - value	< 0.001

As also shown in the next graph (Figure 4) there is a statistically significant difference in HC concentrations between the months of February and March and those of April, May, and June; in fact, the HC concentrations continue to rise reaching its highest concentrations in June.
As shown in Figure 5 the month average THI ranged between a minimum of 43.01 in the February batch and a maximum of 73.48 in the June batch.

Figure 4 – Estimated marginal means (±SEM) of hair cortisol concentrations (pg/mg) recorded in sows (n=296) in the different batches.
Figura 4 – Medie marginali stimate (±SEM) delle concentrazioni di cortisolo nel pelo (pg/mg) registrate nelle scrofe (n=296) nelle diverse bande

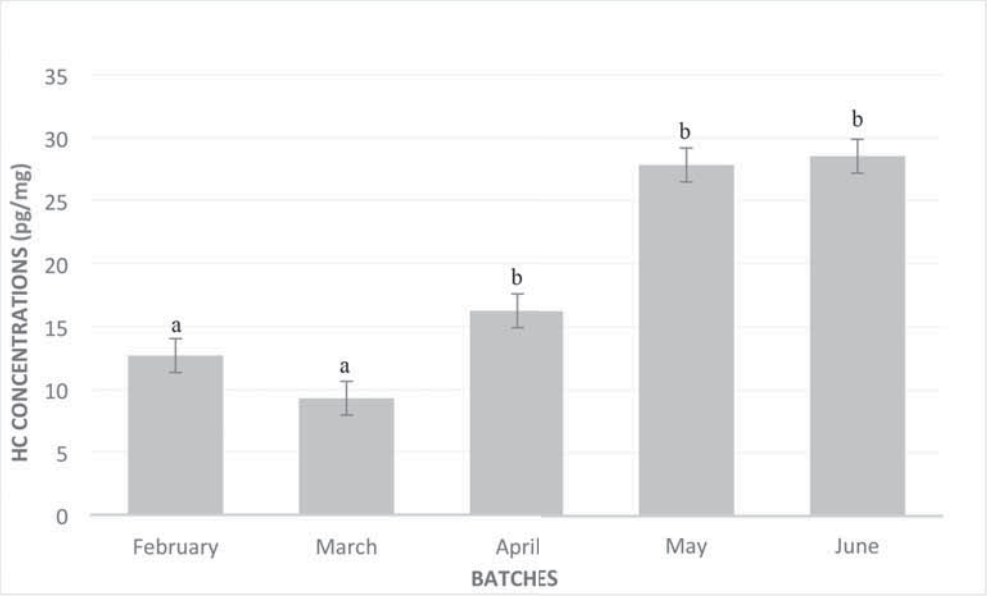
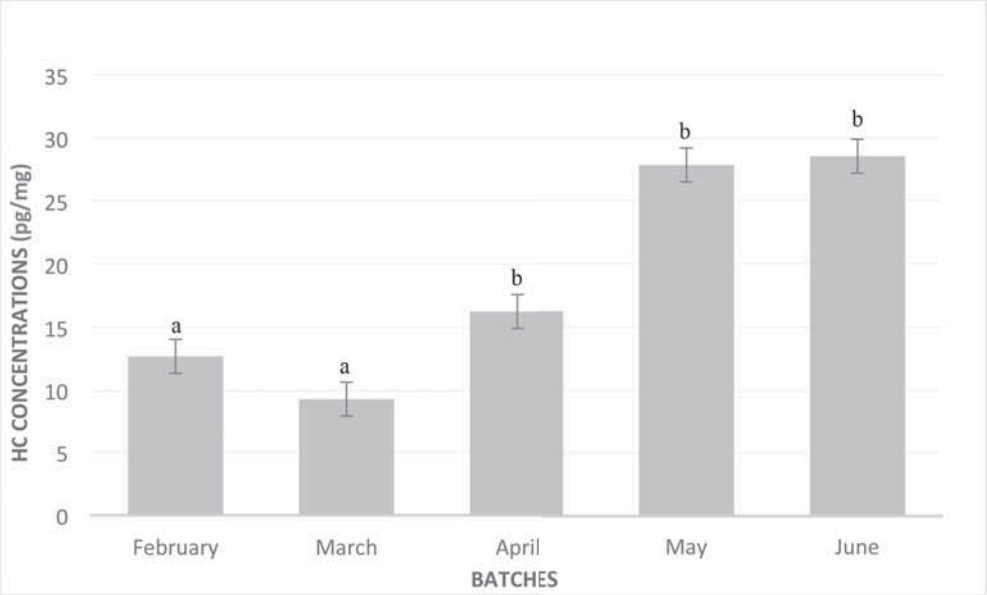


Figure 5 - Temperature, humidity, THI and estimated marginal means (±SEM) of hair cortisol concentrations (pg/mg) recorded in sows (n=296) in the different batches.
Figura 5 - Temperatura, umidità, THI e medie marginali stimate (±SEM) delle concentrazioni di cortisolo nel pelo (pg/mg) registrate nelle scrofe (n=296) nelle diverse bande.



4. DISCUSSION

Considering that hair is a retrospective matrix that allows us to obtain information on the medium-long term period, the hormonal concentrations of the hair samples obtained in this study (a few days before the expected date of farrowing) represented the hormonal status of the sows pre-partum, with the exclusion of the last 15 days.
Sampling operations started at the beginning of February and lasted until the end of June; during this period the average monthly value of THI increased progressively, reaching the highest levels in June.
From the hormonal point of view in our study an interesting progressive increase in HC concentrations throughout the batches was found ($P < 0.01$).
As described previously, after mating, sows remain in the gestation cages for 28 days. Here the animals received ultrasound pregnancy detection and those positive were transferred to multiple pens of 10-15 sows where they remained until 5 days before farrowing.
Thus, considering that the entire management was kept unchanged during the trail and for all the batches, the only environmental change recorded was the THI. Therefore, the increase in HC concentrations, the biomarker of the allostatic load, seems to be linked to the increase in THI.
Being cortisol a metabolic hormone, it is released in response to metabolic demands that can occur facing any stressor. The stress response is not a reflex type but depends on the assessment of the stressful situation and the potential threat that the event represents, in addition depends on the way in which the individual can deal with it, based on personal resources and previous experience at the same type of stressor (Lucassen et al., 2014; Dantzer, 2016).
Moreover, the increased THI observed in this study appeared to have increased the allostatic

load in our sows even if some authors would classify it just as mild stress (Wegner et al. 2016; He et al. 2019).
It has already been reported that the resilience of animals is influenced by various environmental factors and in particular an exposure to increased thermal load reduces their ability to cope with stressors (Colditz & Hine 2016). In fact, so far, the literature reports a higher susceptibility of animals to high environmental temperatures than to lower one (Borges et al, 2020; Bate & Hacker, 1985; He et al, 2019). Sows are particularly sensitive to a hot environment not only because of their lack of effective sweat glands, but also their thick layer of subcutaneous adipose tissue that impedes radiant heat loss (Ross et al., 2015).
Heat stress in pig farms is very important because as described by several authors (Lucy & Safranski, 2017; Mayorga et al., 2020) involves the onset of production problems (reproductive problems associated with inadequate ovarian function such as: anestrus, weak expression or irregular estrus, delayed puberty, irregular oestrus cycles, low farrowing rates, increased abortion rates and reduced litter size, reduction of feed intake leading to a negative energy balance with loss of body condition and reduction of milk production which negatively affects piglet growth and weight at weaning).
Moreover, Sear et al. (1978) observed that the duration of the potential action is decreased by higher temperatures and thus the neuronal transmission and the consequent physiological functioning of the entire organism could be compromised.
Considering, therefore, that the THI, as we have seen, has progressively increased and that this was the only environmental/management change recorded during the study, it seems likely to suggest that during the rearing process act an aggregate effect of different stressors that were exacerbated with a higher THI. There are many stressors in a farming process but the most important stressor to consider is the "social factor"; in fact, as seen by many authors (Martínez-Miró 2016; Li et al. 2017; Verdon et al. 2015; Anil et al. 2006), the movement of sows from the individual pen (during insemination and the beginning of gestation) to the multiple box (during the rest of the gestation period), represents a high-impact stressor: animals are regrouped with unfamiliar conspecifics and, therefore, in this situation the animals fight to determine a new dominant hierarchy. A possible solution to this problem could be the regrouping of familiar individuals or keeping animals in multiple boxes for the entire production process.
Another aspect that can be taken into consideration is the genetic selection of animals. The selection focuses on increasing the growth rate of lean tissue and reproductive capacity but are both accompanied by increased endogenous heat production (Seibert et al., 2018); therefore, the genetic selection should focus considerably more on the robustness of the animals, in order to increase their resilience (Hermesch et al. 2015; Mormede & Terenina 2012).
Anyway, particular attention should be paid also to the environmental temperatures and humidity in which animals are reared. A comfort THI would allow them to be more resilient and to better cope with the other stressors that could affect the rearing process in the different phases; in fact, it would not result as an additional stress to the inevitable ones.

5. CONCLUSIONS

In the present study, the biomarker used to assess the allostatic load in sows allowed us to observe that with an increased THI the animals were subjected to a higher allostatic load; this could lead to a loss of resilience.
Thus, at farms would be necessary to assure a condition of thermoneutrality to avoid that those benefits brought by strategies adopted to improve the animal welfare (as e.g., multiple boxes) could be nullified. Once again, hair allowed us to study the HPA axis without interference of acute changes in hormone concentrations and with an easy sampling procedure.

Finally, based on the data collected by this study, new research could be focused on assessing both allostatic load and resilience (including new markers as DHEA/DHEA-S are and the cortisol/DHEA(S) ratio) in sows pre-and post-partum. The post-partum is another important phase of the reproduction cycle from which depends the farm performances

BIBLIOGRAPHY

1. Albernaz-Gonçalves R., Olmos G. & Hötzel M. J. (2021). *"My pigs are ok, why change - animal welfare accounts of pig farmers"*, Animal, 15(3).
2. Anil L., Anil S.S., Deen J., Baidoo S.K & Walker R.D. (2006). "*Effect of group size and structure on the welfare and performance of pregnant sows in pens with electronic sow feeders*". Canadian Journal of Veterinary Research, Vol 70, pp: 128–136.
3. Bate L.A. & Hacker R.R. (1985). *EFFECT OF CANNULATION AND ENVIRONMENTAL TEMPERATURE ON THE CONCENTRATION OF SERUM CORTISOL IN PREGNANT SOWS*. In Canadian Journal of Animal Science. Vol 65(2).
4. 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 (6).
5. Borges T.D., Huerta-Jimenez M., Casal N., Gonzales J., Panella-Riera N. & Dalmau A. (2020). *To provide a double feeder in growing pigs housed under high environmental temperatures reduces social interactions but does not improve weight gains.* Animals, 10(12), 1-20.
6. Broom D. & Johnson, K. (2019). "*Animal Welfare Stress and Animal Welfare Key Issues in the Biology off Humans and Other Animals Second Edition"*.
7. Broom, D. M. (2010) *"Animal welfare: An aspect of care, sustainability, and food quality required by the public"*, Journal of Veterinary Medical Education, 37(1), pp. 83–88.
8. Buller H., Blokhuis H., Jensen P. & Keeling L. (2018). *"Towards farm animal welfare and sustainability"*. Animals, 8(6), pp. 1–13.
9. Colditz & Hine B. C. (2016). *"Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare"*, Animal Production Science. CSIRO, pp. 1961–1983
10. Council Directive 2008/120 EC. (2008). "*Laying down minimum standards for the protection of pigs"*. Official Journal of the European Union.
11. Dantzer R. (2016). "Behavior: Overview", in *Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook of Stress*. Elsevier, pp. 57–63.
12. Directive 2010/63/EU of the European parliament and the council (2010). "*On the protection of animals used for scientific purposes*". Official Journal of the European Union.
13. European Commission (2021). "*Tackling Antimicrobial Resistance through improved livestock Health and Welfare". Available at: https://cordis.europa.eu/project/id/773436.*
14. Galioto F., Paffarini C., Chiorri M., Torquati B. & Cecchini L. (2017). "Economic, environmental, and animal welfare performance on livestock farms: Conceptual model and application to some case studies in Italy". *Sustainability (Switzerland)*, 9(9)
15. He J., Weijiang Z., Mingzhou L., Xiaojing Y., Yongqiang X., & Wen Y. (2019). *"A Controlled Heat Stress during Late Gestation Affects Thermoregulation, Productive Performance, and Metabolite Profiles of Primiparous Sow."* Journal of Thermal Biology, Vol 81, pp: 33–40
16. Hermesch *S., Li L., Doeschl-Wilson & Gilbert* H. (2015). "*Selection for productivity and robustness traits in pigs*". *Animal Production Science*, Vol 55, pp:1437–1447
17. ISMEA, 2021, *"SETTORE SUINICOLO"*. http://www.ismeamercati.it/carni/carne-suina-salumi. ISMEA (Accessed: 6 April 2021).

18. Korte S. M., Olivier B. & Koolhaas J. M. (2007). "*A new animal welfare concept based on allostasis*". Physiology and Behavior, pp. 422–428.
19. Kubasik N.P. (1984). "*Il dosaggio Radioimmunologico*". Caleidoscopio italiano n°9
20. Li Y.Z.Z., Wang L.H.& Johnston L.J. (2017). "*Effects of social rank on welfare and performance of gestating sows housed in two group sizes*". J. Swine Health Prod. Vol 25, pp: 290–298.
21. Lucassen P. J., Pruessner J., Sousa N., Almeida O.F.X., Van Dam A.M., Rajkowska G., Swaab D. F. & Czéh B. (2014). "*Neuropathology of stress*". Acta Neuropathologica, pp. 109–135.
22. Lucy, M. C. & Safranski, T. J. (2017). "*Heat stress in pregnant sows: Thermal responses and subsequent performance of sows and their offspring*". Molecular Reproduction and Development
23. Mader T.L., Davis M.S., & Brown-Brandl T. (2006). "*Environmental factors influencing heat stress in feedlot cattle*". Journal of Animal Science, Volume 84, Issue 3, pp: 712–719,
24. Marchant Forde J. N. (2019). *The welfare of pigs*.
25. Martínez-Miró S., Tecles F., Ramón M, Escribano D., Hernández F., Madrid J., Orengo J., Martinez-Subiela S., Manteca X. & Cerón J.J. (2016). "*Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: An update*". BMC Veterinary Research. BioMed Central Ltd
26. Mayorga, E. J., Ross J.W., Keating A.F., Rhoads R.P. & Baumgard L.H. (2020). "*Biology of heat stress; the nexus between intestinal hyperpermeability and swine reproduction*". Theriogenology. Elsevier Inc., pp. 73–83.
27. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali. (2011). *LINEE PROGRAMMATICHE PERUN PIANO DI SETTORE SUINICOLO*. Available at: http://www.ismeamercati.it/carni/carne-suina-salumi (Accessed: 6 April 2021).
28. Moberg, G. P. (1985). "*Influence of Stress on Reproduction: Measure of Well-being*", Animal Stress, pp. 245–267.
29. Mormede P. & Terenina E. (2012). *"Molecular genetics of the adrenocortical axis and breeding for robustness"*. Domestic Animal Endocrinology, Vol 43, pp: 116–131
30. Pierozan C. R.*, Dias C.P., Temple D., Manteca X. & Da Silva C.A.* (2021). "*Welfare indicators associated with feed conversion ratio and daily feed intake of growing-finishing pigs*". Animal Production Science, 61(4), pp. 412–422.
31. 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.
32. Ross J.W., Hale B.J., Gabler N.K., Rhoads R.P., Keating A.F. & Baumgard L.H. (2015). "*Physiological consequences of heat stress in pigs*. Animal Production Science", 55(11-12), 1381-1390
33. Russell E., Koren G., Rieder M., & Van Uum S., (2012). *"Hair Cortisol as a Biological Marker of Chronic Stress: Current Status, Future Directions and Unanswered Questions."* Psychoneuroendocrinology.
34. Sear T.A., Bostock K.H. & Sherratt R.M. (1978). *"Overcoming conduction failure in demyelinated nerve fibres*". Nature, Vol 271, pp: 385-387
35. Seibert J.T., Graves K.L., Hale B.J., Keating A.F., Baumgard L.H. & Ross J.W. (2018). "*Characterizing the acute heat stress response in gilts: I. Thermoregulatory and production variables*". Journal of Animal Science, Vol 96, Issue 3, pp: 941-949
36. Špinka, M. (2017). "*Advances in pig welfare"*.
37. Veissier I. & Boissy A. (2007). "*Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view*". Physiology and Behavior. Vol 92(3), pp. 429–433.

38. Velarde A., Fàbrega E., Blanco-Penedo I., & Dalmau A. (2015). *"Animal Welfare towards Sustainability in Pork Meat Production."* Meat Science. Vol 109: 13–17.
39. Verdon M., Hansen C.F., Rault J.L., Jongman E., Hansen L.U, Plush K., & Hemsworth P.H. (2015). *"Effects of group housing on sow welfare: A review"*. Journal of Animal Science, Vol 93, pp: 1999–2017
40. Wang Z. & Goonewardene L.A. (2004). "*The use of mixed models in the analysis of animal experiments with repeated measures data*". Canadian Journal of Animal Science. Vol 84, pp:1-11
41. Webster, J. (2011). *"Husbandry and Animal Welfare - Management and welfare of farm animals". pp. 1–30.*
42. Wegner K., Lambertz C., Das G., Reiner G., & Gauly M. (2016). *"Effects of Temperature and Temperature-Humidity Index on the Reproductive Performance of Sows during Summer Months under a Temperate Climate."* Animal Science Journal. Vol 87 (11).
43. Yuan F., Zhang H. & Liu T. (2020). *"Stress-free detection technologies for pig growth based on welfare farming: A review".* Applied Engineering in Agriculture. Vol 36(3), pp. 357–373

PREMIO
FORMAZIONE PROFESSIONALE ESTERO 2020

VALUTAZIONE DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA INIBENTE (MIC) E DELLA CONCENTRAZIONE MINIMA BATTERICIDA (MBC) MEDIANTE METODO DI DILUIZIONE IN BRODO DI CINQUE DIVERSI DISINFETTANTI

EVALUATION OF MINIMUM INHIBATORY CONCENTRATION (MIC) AND MINIMUM BACTERICIDAL CONCENTRATION (MBC) THROUGH BROTH DILUTION METHOD FOR FIVE DIFFERENT DISINFECTANTS

MONTAGNIN C.[1], CAWTHRAW S.[2], DAVIES R.[2], SMITH R.P.[3], RING I.[2], DE LUCIA A.[1], OSTANELLO F.[1], MARTELLI F.[2]

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

Parole chiave: disinfettanti, concentrazione minima inibente (MIC), concentrazione minima battericida (MBC)
Keywords*: disinfectant, minimum inhibatory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC)*

RIASSUNTO
La crescente minaccia dell'antimicrobico-resistenza (AMR) comporta una sempre maggior preoccupazione in campo medico, veterinario ed ambientale, portando all'esigenza di elaborare nuove e valide strategie per contrastare in maniera efficace le patologie causate da batteri. In questo contesto, corrette pratiche di biosicurezza unitamente ad un uso responsabile dei disinfettanti hanno guadagnato un ruolo cruciale nella lotta alle infezioni batteriche. In questo studio è stato verificato se le concentrazioni d'uso raccomandate (c.d. *General Order,* GO) di cinque diverse preparazioni commerciali di disinfettanti (Virkon S®, Interkokast®, FAM30®, Virocid®, Agrochlor®) fossero adeguate ad inibire la crescita ed inattivare 15 diversi ceppi batterici, alcuni dei quali veicolanti modelli fenotipici noti di AMR. L'efficacia di ciascun disinfettante è stata espressa come valore di concentrazione minima inibente (MIC) e concentrazione minima battericida (MBC), determinate tramite micrometodo. I risultati indicano che, *in vitro*, il tipo di disinfettante e la sua concentrazione d'uso influenzano l'efficacia inibente e battericida. In particolare, i prodotti a base di QAC/Glutaraldeide e clorocresolo si sono dimostrati i più efficaci e in nessun caso la concentrazione inibente e battericida superava il GO. Risultati differenti sono stati osservati per gli altri composti in funzione della specie batterica testata ed è emersa una scarsa efficacia dei presidi a base di iodio (FAM30®) e di perossimonosolfato (Virkon S®). È stata inoltre osservata una maggiore resistenza all'azione di diversi presidi disinfettanti da parte di ceppi di *Escheria coli* con diversi profili fenotipici di AMR rispetto agli altri ceppi di *E. coli* sensibili.

ABSTRACT
The growing threat of antimicrobial resistance (AMR) worldwide has led to an increasing concern in the human, veterinary and environmental fields, highlighting the need of new and valid strategies to effectively face diseases caused by bacteria. In this scenario, correct biosecurity practices together with the responsible use of disinfectants have gained a

crucial role in the fight against bacterial infections. This study aimed to verify whether the recommended use concentrations (so-called General Order, GO) of five different commercial disinfectant preparations (Virkon S®, Interkokast®, FAM30®, Virocid®, Agrichlor®) were adequate to inhibit growth and inactivate 15 various bacterial strains, including some which carry known phenotypic patterns of AMR. The effectiveness of each disinfectant was expressed as the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) values, determined by micromethod. The results indicate that, *in vitro*, the type of disinfectant and its concentration influence the inhibitory and bactericidal efficacy. In particular, the QAC/Glutaraldehyde-based and chlorocresol-based products seemed to be the most effective and the inhibitory and bactericidal concentration never exceed the GO. On the contrary, different results were observed for the other compounds depending on the bacterial species tested and a poor efficiency of the iodine-based (FAM30®) and peroximonosulphate-based (Virkon S®) products emerged. Interesting was also the finding of a greater resistance to the compounds of the strains of *Escherichia coli* with different phenotypic profiles of AMR compared to other *E. coli* strains sensitive to the same antibiotics.

INTRODUZIONE

Nell'ultimo decennio il fenomeno dell'antimicrobico-resistenza (AMR) ha subito un preoccupante incremento. Già nel 1942, pochi anni dopo la scoperta della penicillina, vennero isolati ceppi di *Staphylococcus aureus* penicillino-resitenti (Lowy, 2003). Oggi, dopo mezzo secolo di utilizzo degli antimicrobici (inclusi antibiotici, antivirali ed antiparassitari), il fenomeno della resistenza è diventato un problema globale tanto che il World Health Organization l'ha inserito nella lista delle dieci maggiori minacce alla salute pubblica che l'umanità si trova a dover affrontare (WHO, 2020).

Poiché la resistenza antimicrobica, e in particolare la resistenza agli antibiotici, è diventata una minaccia in tutto il mondo, il Governo del Regno Unito, così come i Governi di numerosi altri Paesi, ha tentato di incentivare l'uso consapevole e responsabile degli antibiotici vietandone l'impiego come promotori della crescita e pubblicando periodicamente linee guida che enfatizzano la necessità di applicare misure più rigorose di controllo e prevenzione delle infezioni (vedi, ad esempio: https://www.gov.uk/health-and-social-care/antimicrobial-resistance).

In questo scenario, migliori pratiche di biosicurezza e un uso appropriato dei biocidi hanno acquisito un ruolo fondamentale nella prevenzione e nel controllo delle infezioni, tutelando la salute degli animali e dell'uomo (Bragg et al., 2018). "Biocida" è un termine generico che indica un prodotto chimico in grado di inattivare i microrganismi (McDonnell and Russell, 1999). I disinfettanti sono composti biocidi ampiamente utilizzati nella produzione primaria in quanto fondamentali nell'ambito delle procedure di biosicurezza degli allevamenti intensivi. Un impiego responsabile di questi presidi gioca un ruolo cruciale nelle procedure di pulizia e disinfezione, soprattutto quando viene applicato nell'ambito di una gestione tutto pieno/tutto vuoto. Un uso consapevole dei disinfettanti non può tuttavia prescindere da una profonda conoscenza dei componenti attivi e della loro efficacia contro le diverse popolazioni batteriche (McLaren et al., 2011). Ciò anche in funzione del fatto che è stata osservata una correlazione positiva tra corrette procedure di pulizia e disinfezione e riduzione dell'uso degli antimicrobici (Raasch et al., 2018).

Tuttavia, l'impiego crescente di disinfettanti ha determinato la genesi di alcune ipotesi sulla possibilità di sviluppo di una minore sensibilità ai disinfettanti da parte dei batteri e sullo sviluppo di una resistenza crociata agli antibiotici (Maertens et al., 2019; McDonnell and Russell, 1999).

Si ritiene che, se usati correttamente, i biocidi disinfettanti non possano indurre resistenza nei batteri (sia agli antibiotici che ai disinfettanti) in quanto il loro meccanismo d'azione è principalmente aspecifico e multifattoriale. I disinfettanti sono spesso costituiti da miscele di componenti attivi che esplicano la loro tossicità nei confronti di diversi target microbiotici (Maris, 1995; McDonnell and Russell, 1999) e una mutazione all'interno di un singolo gene non sarà in genere in grado di conferire resistenza (Jones et al., 2000). Inoltre, le loro concentrazioni d'uso raccomandate sono in genere molto al di sopra delle concentrazioni minime inibenti (MIC) (Wieland et al., 2017). Tuttavia, i batteri possono sviluppare resistenza nei confronti dei disinfettanti quando le concentrazioni d'uso sono inferiori rispetto a quelle necessarie per ottenere l'effetto batteriostatico o battericida (Nasr et al., 2018), a causa di una diluizione eccessiva, della presenza di materia organica o di biofilm (pulizia insufficiente prima della disinfezione) o della presenza di residui dopo la disinfezione (Amass et al., 2000; Webber et al., 2015).
Diverse prove sperimentali *in vitro* hanno evidenziato una correlazione tra la resistenza agli antibiotici e quella ai disinfettanti (Khan et al., 2016; Templeton et al., 2009), mentre ulteriori studi hanno dimostrato che l'esposizione a concentrazioni sub-letali di disinfettanti potrebbe selezionare mutanti con una sensibilità ridotta agli antimicrobici e agli antibiotici a causa di un fenomeno di co-selezione (Kim et al., 2018).
Nel Regno Unito, il *Department for Environmental Food and Rural Affairs* (DEFRA) ha pubblicato un elenco di disinfettanti approvati e idonei all'uso in caso di focolai di specifiche malattie soggette a notifica (Anonimo, 2007), riportando anche le concentrazioni d'uso raccomandate in queste circostanze. Il DEFRA ritiene che questi disinfettanti possano essere utilizzati anche durante le procedure routinarie di pulizia e disinfezione e fornisce la concentrazione d'uso raccomandata (*General Order* GO, espressa come rapporto acqua/disinfettante: http://disinfectants.defra.gov.uk/). I test di valutazione dell'efficacia di ciascuna formulazione di disinfettante vengono eseguiti dall'*Animal and Plant Health Agency* (APHA, Addlestone, UK) utilizzando *Salmonella* Enteritidis come organismo di challenge. Il test si considera superato quando, *in vitro*, la concentrazione di *Salmonella* viene ridotta di almeno 5 log.
Lo scopo del presente lavoro è stato quello di verificare se le concentrazioni d'uso raccomandate (GO) per cinque diversi disinfettanti fossero adeguate ad inibire la crescita e ad inattivare 15 ceppi batterici isolati da diversi allevamenti di suini, alcuni dei quali hanno mostrato modelli fenotipici noti di AMR.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici utilizzati

L'eventuale resistenza nei confronti di diversi composti disinfettanti di 16 diversi ceppi batterici è stata valutata determinando la concentrazione minima inibente (MIC) e la concentrazione minima battericida (MBC). I ceppi sono stati isolati in diversi allevamenti di suini oggetto di studi precedenti e conservati presso l'APHA.
Sono stati utilizzati 10 ceppi geneticamente distinti di *E. coli*, 4 dei quali presentavano pattern fenotipici diversi e noti di AMR. Il panel di antibioticoresistenza di questi ceppi di *E. coli* AMR è riportato nella Tabella 1.
Gli altri 5 ceppi batterici utilizzati sono stati: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Enterococcus hirae* e *Salmonella* Enteritidis.

Tabella 1: Profili di antibiotico-resistenza dei quattro ceppi di Escherichia coli utilizzati nello studio
Table 1. *Antibiotic resistance of the four antimicrobial resistant Escherichia coli strains selected for the study*

Ceppo	AMP	AZM	CTX	CAZ	CHL	CIP	CST	GEN	MEM	NAL	SFX	TET	TIG	TMP	Fenotipo
4536	64	4	4	2	8	0,02	1	0,5	0,03	4	1024	64	0,5	32	ESBL/ AMPC
4512	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	ESBL
4534	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R	AMP C
2229							R								

Note: AMP (ampicillina), AZM (azitromicina), CTX (cefotaxime), CAZ (ceftazidima), CHL (cloramfenicolo), CIP (ciprofloxacina), CST (colistina), GEN (gentamicina), MEM (meropenem), NAL (acido nalixi), SFX (sulfametoxazolo), TET (tetraciclina), TIG (tigeciclina), TMP (trimetoprim); S=sensibile; R=resistente

Disinfettanti utilizzati
Cinque diversi disinfettanti, acquistati da fornitori commerciali, a 8 diverse concentrazioni, sono stati testati contro i 15 ceppi batterici. La scelta dei disinfettanti è stata funzionale ai ceppi batterici oggetto di studio, dal momento che tutti i prodotti testati sono tipicamente destinati ad un uso veterinario, compresa la disinfezione delle strutture e dei mezzi di trasporto.
I disinfettanti commerciali utilizzati sono stati i seguenti: Virkon S® (Antec International Limited); Interkokask® (Interhygiene GmbH); FAM30® (Evans Vanodine International Plc); Virocid® (Cid Lines UK); Agrichlor® (Hydrachem Limited). Le principali caratteristiche dei disinfettanti e le loro concentrazioni d'uso raccomandate (GO) sono riportate in Tabella 2.
Virkon S® è un disinfettante granulare ad ampio spettro, che si attiva a contatto con l'acqua. Si tratta di una miscela stabilizzata di un perossido (potassio perossimonosolfato, KMPS), un tensioattivo (sodio dodecilbenzensolfato), acidi organici (acido malico e solfamidico), un tampone inorganico (sodio esametafosfato) ed un sale (cloruro di sodio). Il principale componente attivo è il KMPS, che ossida le proteine delle cellule batteriche distruggendone la struttura fisica. La sua attività antibatterica è potenziata dal cloruro di sodio, che reagisce con il KMPS e forma un altro potente biocida, l'acido ipocloroso.
Interkokask® è un disinfettante a base di clorocresolo. Il cresolo è attivo sia sulla membrana che sul citoplasma batterico: a basse concentrazioni determina la perdita di integrità della membrana mentre a concentrazioni più elevate ha un effetto coagulativo sui costituenti citoplasmatici (McLaren et al., 2011; Russell, 2003).
Due diversi disinfettanti appartengono alla classe degli agenti rilascianti alogeni: FAM30ª e Agrichlor®.
FAM30ª è un disinfettante detergente contenente una miscela di iodofori, acido solforico e acido fosforico. L'attività battericida è determinata dallo iodio molecolare libero (I_2),

stabilizzato in soluzione dagli iodofori (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011). Lo iodio uccide le cellule inibendo la funzione delle proteine e reagendo con nucleotidi e acidi grassi (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011; Punyani et al., 2006).
Agrichlor® è una compressa effervescente di cloro idrosolubile contenente troclosene sodico (NaDCC) come composto attivo. Sciolto in acqua genera una soluzione disinfettante mediante il rilascio della forma attiva del cloro, che si comporta da agente ossidante altamente attivo (McDonnell and Russell, 1999). L'esatto meccanismo d'azione di questo presidio non è stato ancora del tutto chiarito, ma si ritiene che sia riconducibile all'inibizione di alcuni enzimi responsabili di reazioni chiave per la sopravvivenza cellulare, come il ciclo replicativo o la sintesi proteica (Gall et al., 2015).
Virocid® è uno dei disinfettanti più concentrati e possiede un›elevata attività antimicrobica a diluizioni estremamente basse. Consiste in una miscela di 4 diversi gruppi di composti attivi: una combinazione di sali quaternari di ammonio (QAC), glutaraldeide, alcool (isopropanolo) e olio di pino, addizionati di agenti tamponanti e stabilizzanti. I QAC sono tensioattivi cationici che causano un danneggiamento della membrana cellulare (McDonnell and Russell, 1999; McLaren et al., 2011) ed effetti anche sul citoplasma batterico, quando impiegati ad elevate concentrazioni (Lambert, 2013), mentre la glutaraldeide è un agente alchilante e determina legami crociati inter- ed intra-proteici.
Ciascun disinfettante è stato diluito in brodo di Mueller Hinton (MHB) fino a 4 volte la concentrazione d'uso raccomandata dal DEFRA. Quando questa concentrazione iniziale non consentiva di determinare la MIC e la MBC, è stata scelta la concentrazione più bassa o quella più alta.
Nella maggior parte dei casi quindi, le concentrazioni testate coprivano un intervallo che andava da una concentrazione inferiore ad una superiore rispetto al valore raccomandato (GO) dal DEFRA. Solo l'Agrichlor è stato diluito in un uguale volume di MHB e acqua e lasciato a -4°C per un'ora prima del test.
Sono state valutate sia la capacità batteriostatica (MIC) che quella battericida (MBC) ed i risultati ottenuti sono stati espressi come rapporto di diluizione.

Determinazione della Concentrazione Minima Inibente (MIC)
I valori di MIC di ciascuna formulazione di disinfettante nei confronti dei 15 ceppi batterici utilizzati sono stati determinati mediante il metodo di microdiluizione in brodo. Dopo una incubazione *overnight*, le colonie batteriche sono state raccolte con un tampone sterile e sospese in acqua demineralizzata sterile (Thermo Scientific). La sospensione batterica è stata miscelata mediante vortex e regolata utilizzando un nefelometro (Thermo Scientific) per la misurazione automatica della torbidità, fino a ottenere una densità ottica (OD) di 0,5 NTU (unità di torbidità nefelometrica) sulla scala di McFarland.
Venti microlitri di sospensione batterica sono stati quindi diluiti in 11 mL di brodo Mueller-Hinton con TES (Thermo Scientific), ottenendo una concentrazione batterica iniziale di circa 10^5 CFU/mL. Per verificare la correttezza della concentrazione, la sospensione batterica iniziale è stata diluita a 10^{-2} e 10^{-3} e utilizzata per seminare, in duplicato, piastre di BloodAgar o CHROMagar. Dopo 24 ore di incubazione, è stato effettuato il conteggio delle colonie, calcolando la concentrazione batterica in funzione della diluizione utilizzata.
Ciascun disinfettante è stato diluito in brodo Mueller-Hinton (MHB) ad una concentrazione pari al doppio di quella iniziale decisa precedentemente per il test. Cinquanta microlitri della miscela MHB-disinfettante sono stati successivamente distribuiti, in triplicato, nella prima fila di una piastra a micrometodo a 96 pozzetti (EUVSEC, Thermo Scientific), già precedentemente caricata, a partire dalla seconda fila, con 50 mL di MHB. Sono state

quindi effettuate delle diluizioni seriali per raddoppio procedendo dalla prima all'ultima fila della piastra. Successivamente, 50 mL di inoculo batterico (contenente circa 10^5 CFU/mL) sono stati aggiunti alla miscela MHB-disinfettante, ottenendo un volume totale di 100 µL/pozzetto ed un'ulteriore diluizione del disinfettate, che in questo modo raggiungeva, nella prima fila di tre pozzetti, la concentrazione iniziale decisa in precedenza.
La concentrazione iniziale relativa ad alcune combinazioni disinfettante/ceppo batterico è stata in seguito modificata in considerazione dell'impossibilità di assegnare il valore di MIC e di MBC. Le concentrazioni iniziali dei disinfettanti sono riportate in Tabella 2.
Come controllo positivo, 50 µL di ciascuna sospensione batterica sono stati aggiunti a 50 µL di MHB senza disinfettante. Le piastre sono state quindi incubate per 18-24 ore a 37°C. Dopo tale periodo, la torbidità è stata valutata mediante Vizion (Thermo Scientific, Digital MIC Viewing System) e la concentrazione più bassa senza torbidità osservabile è stata stabilita come valore MIC.
Per tutte le combinazioni disinfettante/ceppo batterio sono state eseguite 3 repliche in due diversi momenti (per un totale di 6 valori di MIC) usando una diluizione del disinfettante ed una sospensione batterica di 10^5 CFU/mL preparate al momento della prova.

Tabella 2: *caratteristiche dei disinfettanti utilizzati e le loro concentrazioni d'uso raccomandate (GO)*
Table 2. *Characteristics of the disinfectants used and their recommended concentrations (GO)*

Disinfettante	Categoria	Principi attivi	General Order (concentrazione d'uso raccomandata)	Concentrazione iniziale
Virkon S	Peroxygen	Potassio perossimonosolfato, Cloruro di sodio	100[a]	25 400[c]
Interkokast	Phenol	Clorocresolo	50[b]	25 400[d] 100[e]
FAM30	Halogen-releasing agent (Iodine releasing agent)	Iodio, Acido solforico e Acido fosforico	49[b]	24,5
Virocid	Quaternary ammonium compound + aldehyde	Alkyl dimethyl benzyl ammonium chloride, Didecyl dimethyl ammonium chloride, Glutaraldeide	33[b]	ND[f]
Agrichlor	Halogen-releasing agent (Chlorine realizing agent)	Troclosene sodico NaDCC	360[a]	180 500[g]

[a] *millilitri di acqua o solvente/grammo di prodotto;* [b] *millilitri di acqua o solvente/millilitro di prodotto;* [c]*concentrazione iniziale contro Staphylococcus aureus e Pseudomonas aeruginosa;* [d] *concentrazione iniziale contro Staphylococcus aureus;* [e] *concentrazione iniziale contro Enterococcus hirae;* [f] *Non definibile;* [g] *concentrazione iniziale contro Salmonella* Enteritidis *e E. coli MSG17 C20*

Determinazione della Concentazione Minima Battericida (MBC)
Per determinare il valore di MBC, un'aliquota di 10 µL è stata prelevata da ciascun pozzetto della piastra utilizzata per il calcolo del valore di MIC e seminata in triplicato su due diverse piastre di Agar Sangue. Una volta asciugate, le piastre sono state incubate per 18-24 ore a 37°C. È stato stabilito che la concentrazione più bassa in cui non veniva osservata alcuna crescita batterica visibile rappresentasse il valore di MBC (riduzione di circa 5 log del numero di CFU).
Per tutte le combinazioni disinfettante/ceppo batterio sono state eseguite 6 repliche in due diversi momenti (per un totale di 12 valori di MBC) usando una diluizione del disinfettante ed una sospensione batterica di 10^5 CFU/mL preparate al momento della prova.

Analisi statistica
Per ciascuna combinazione disinfettante/ceppo batterico, la MIC è stata calcolata come media geometrica dei valori ottenuti nelle 3 repliche eseguite in due diversi momenti (per un totale di 6 valori). Analogamente, la MBC **è stata calcolata** come media geometrica dei valori ottenuti nelle 6 repliche eseguite in due diversi momenti (per un totale di 6 valori).
In considerazione del fatto che solo l'effetto battericida è di reale utilità nell'ambito della disinfezione, oltre ad una prima categorizzazione in "sensibili" e "resistenti", sulla base del valore di MBC, gli organismi hanno subito un'ulteriore distinzione: i "particolarmente sensibili" e gli "estremamente sensibili", microrganismi per i quali il valore di MBC era inferiore o uguale rispettivamente alla metà e a un terzo del GO (MBC≤2×GO e MBC≤3×GO).
La stima della normalità della distribuzione campionaria dei valori di MIC e MBC è stata realizzata utilizzando il test di Kolmogorov-Smirnov. Sulla base dei risultati di questo test, eventuali differenze dei valori di MIC e MBC tra i ceppi di *E. coli* con profili di antibiotico-resistenza e quelli pienamente sensibili, **è stat**a realizzata utilizzato il test di *U* di Mann-Whitney. Le analisi sono state eseguite utilizzando il software SPSS 26.0 (IBM SPSS Statistics, NY, USA). La significatività statistica è stata fissata a valori di $p<0,05$.

RISULTATI
In nessuna delle combinazioni disinfettante/ceppo batterico la media geometrica dei valori di concentrazione minima inibente (MIC) è risultata superiore alla concentrazione d'uso raccomandata (GO). Tuttavia, per Virkon S, FAM 30 ed Agrichlor, la concentrazione minima battericida (MBC) determinata *in vitro* è risultata superiore al GO per alcuni ceppi batterici (Tabella 3).

Concentrazione minima inibente/Concentrazione minima battericida
Per tutti i disinfettanti commerciali testati, i valori di MIC sono risultati inferiori alla loro concentrazione d'uso raccomandata (MIC≤GO), sia nei valori assoluti che nella media geometrica degli stessi. Tuttavia, per ottenere un'azione battericida sono necessarie dosi maggiori di disinfettante rispetto a quelle che determinano l'effetto batteriostatico. Non tutti i disinfettanti valutati sono stati in grado di inattivare i batteri testati ad una concentrazione inferiore o uguale a quella raccomandata (GO) e sono state necessarie dosi maggiori di prodotto per osservare l'effetto battericida (MBC>GO).
Complessivamente, 9 dei 15 ceppi batterici utilizzati hanno evidenziato una resistenza all'azione battericida di almeno un presidio disinfettante, tra questi *P. aeruginosa* e *S. aureus* a un solo disinfettante (rispettivamente Agrichlor e FAM30), *P. vulgaris, S.* Enteritidis ed *E. coli* ceppo MSG17C20 a due (Virkon S e FAM30). I 4 ceppi di *E. coli*

con profili noti di AMR hanno evidenziato una resistenza all'azione battericida di Virkon S, FAM30 ed Agrichlor. Al contrario, cinque dei sei ceppi di *E. coli* non AMR e *E. hirae*, sono stati inattivati da tutti i prodotti commerciali e ad una concentrazione inferiore o uguale (come nel caso di Agrichlor) a quella d'uso raccomandata (GO).
Virocid e Interkokast hanno manifestato sia un'azione batteriostatica sia un'azione battericida alla concentrazione definita dal loro GO per tutti i ceppi batterici testati. Nonostante la MIC e la MBC del presidio si attestassero sempre al di sotto del GO, sono state evidenziate differenze tra le diverse specie batteriche e, all'interno della specie *E. coli*, tra i diversi ceppi.
Interkokast (GO: 50), è il secondo presidio per numero di ceppi classificati come "estremamente sensibili" (n=10). Insieme al Virkon S, è stato il disinfettante per cui è stata osservata la maggiore differenza tra i valori di MIC e di MBC. Nel dettaglio, i valori di MIC e di MBC per *E. hirae* (rispettivamente 1:1796 e 1:1131) e per *S. aureus* (rispettivamente 1:5701 e 1:672) sono risultati i più bassi tra tutti i ceppi batterici esaminati. Per *S. aureus* è stata osservata anche la maggior variabilità tra i valori di MIC e quelli di MBC (MIC/MBC=8,5) (Figura 1B). La crescita di *P. vulgaris* e *P. aeruginosa*, con valori di MIC rispettivamente di 1:898 e 1:1425, è stata efficacemente inibita da Interkokast, mentre per la loro inattivazione le concentrazioni sono risultate almeno cinque volte più elevate (MBC, rispettivamente 1:141 e 1:283). I valori di MIC e di MBC dei 7 ceppi di *E. coli* non AMR esposti all'azione di Interkokast sono relativamente simili per tutti i ceppi (1:504<MIC<1:365; 1:400<MBC<1:168), al contrario di quanto è stato osservato per i ceppi di *E. coli* AMR, per i quali il rapporto MIC/MBC variava da 3,2 a 6,7 (Figura 1B). I 4 ceppi di *E. coli* con profili noti di AMR, pur rimanendo "sensibili", hanno manifestato la maggior resistenza all'azione battericida di Interkokast, tanto che la MBC ottenuta per uno di essi (*E. coli* ceppo 4534) era pari alla concentrazione d'uso raccomandata.
Per quanto riguarda Virocid, nonostante l'elevata concentrazione d'uso raccomandata (GO: 33), il prodotto è risultato avere un'azione inibente o battericida anche a diluizioni di oltre 4000 volte superiori. I valori di MIC e MBC più bassi sono stati quelli per *S. aureus* (MIC=MBC 1:135168) e *P. aeruginosa* (MIC=MBC 1:67584). Nessuno dei ceppi batterici esaminati ha però espresso resistenza all'azione battericida di Virocid, tanto che la MBC più elevata è stata 102 volte inferiore al GO (*S.* Enteritidis, MBC 1:3364) e tutti i batteri sono stati definiti "estremamente sensibili" all'inattivazione da parte di questo presidio (MBC≤3×GO). I valori di MIC e di MBC coincidevano (MIC=MBC) per 8 dei 15 ceppi batterici esaminati: *P vulgaris* (1:33792), *S. aureus* (1:135168), *P. aeruginosa* (1:67584) e cinque dei sei ceppi di *E. coli* non AMR (ceppo 25922, 1:33792; ceppo 4526, 1:23895; ceppo 4527, 1:23895; ceppo 4529, 1:21288; ceppo 4531, 1:16896). Solo per *S.* Enteritidis la differenza tra il valore di MIC e quello di MBC è stata più marcata (rispettivamente 1:22627 e 1:3364; MIC/MBC=6,7) (Figura 1E).
S. aureus e *P. aeruginosa* sono risultati "estremamente sensibili" anche nei confronti di Virkon S (MIC: *S. aureus* 1:6400, *P. aeruginosa* 1:2263; MBC: *S. aureus* 1:6041, *P. aeruginosa* 1:1695). Anche per *E. hirae* l'azione inibente e battercida di Virkon S, utilizzato alla concentrazione d'uso raccomandata (GO 100) è stata efficace (MIC 1:200; MBC 1:159). Il valore di MIC di *P. vulgaris* (1:504) è stato uno dei più bassi osservati per questo disinfettante. Tuttavia, il valore di MBC è risultato superiore rispetto al GO (MBC 1:94) e, per tale motivo, *P. vulgaris* è stato classificato come "resistente" a Virkon S. Anche *S.* Enteritidis (MBC 1:53) ed uno dei quattro *E. coli* non AMR (ceppo MSG17C20: MBC 1:53), venivano inibiti nella crescita da Virkon S, ma si mantenevano vitali a concentrazioni superiori al GO. Inoltre, per i restanti cinque ceppi di *E. coli*

non AMR, il valore di MIC si sovrapponeva a quello di MBC (la stessa concentrazione di disinfettante non solo inibiva la crescita ma inattivava anche i batteri) ed era, per tutti tranne uno (ceppo 4526, MIC=MBC 1:283) pari a 1:200 (Figura 1A). Tuttavia, se una diluizione pari a 1:200 o a 1:283 di Virkon S era in grado di inibire tutti i ceppi di *E. coli* testati e di uccidere i ceppi non AMR, i quatto ceppi di *E. coli* con profili di antibiotico-resistenza hanno invece dimostrato una certa resistenza all'effetto battericida del Virkon S alla sua diluizione consigliata (MBC>GO) (ceppo 4512, MBC 1:26; ceppo 4534, MBC 1:25; ceppo 4536, MBC 1:40; ceppo 2229, MBC 1:26). Inoltre, l'MBC è risultato sempre almeno 5 volte superiore rispetto alla MIC (Figura 1A). In generale, insieme a Interkokast, Virkon S è stato il presidio per il quale la differenza tra i valori di MIC e di MBC era maggiore ma, a differenza di Virkon S, la MBC di Interkokast non superava mai il valore del GO (Figura 1B).

FAM 30 (GO: 49) è stato il disinfettante commerciale per il quale è stata osservata la maggior prevalenza di resistenze all'azione battericida da parte dei ceppi batterici oggetto di studio. Infatti, mentre la MIC è risultata costantemente inferiore al GO per tutti i ceppi batterici esaminati (Figura 1C), 8 dei 15 ceppi sono risultati "resistenti" all'azione battericida (MBC>GO), compreso *S. aureus* (MBC 1:41), che aveva espresso elevate sensibilità nei confronti di tutti gli altri presidi. Gli altri batteri con MBC>GO erano: *P. vulgaris* (MBC 1:35), *S.* Enteritidis (MBC 1:37); *E. coli* ceppo MSG17C20 (MBC 1:29), ed i quattro ceppi di *E. coli* AMR (ceppo 4512, 1:37; ceppo 4534, 1:28; ceppo 4536, 1:29; ceppo 2229, 1:28). Tutti i 6 ceppi di *E. coli* non AMR hanno presentato valori di MIC inferiori al GO; anche l'MBC è risultata, con l'eccezione del ceppo MSG17C20, inferiore al GO. *E. hirae* e *P. aeruginosa* hanno espresso entrambi valori di MBC pari a 1:156, valore che ha permesso di classificarli come "estremamente sensibili", insieme a *E. coli* ceppo 25922 (MBC 1:196). È interessante osservare come, per FAM30, le MIC di *S. aureus* (1:69) e *P. vulgaris* (1:55) sono risultate molto prossime al GO (49). Ciò non è stato osservato per Virkon S e Interkokast, per i quali la MIC non superava mai la metà della concentrazione prevista dal GO. FAM30 è stato il disinfettante per il quale è stato osservato il range più basso dei valori di MIC e di MBC verso le diverse specie batteriche (1:98≤MIC≤1:196; 1:27,5≤MBC≤1:196).

Anche per Agrichlor (Figura 1D), il valore di MIC era pari alla concentrazione d'uso raccomandata (GO: 360) per 7 dei 15 ceppi batterici esaminati (tra cui 4 dei 6 ceppi di *E. coli* non AMR, due dei ceppi di *E. coli* AMR e *P. aeruginosa*), mentre per 3 ceppi batterici la diluizione impiegata era di poco inferiore del doppio rispetto a quella prevista dal GO (*E. coli* 4534, 1:509; *E. coli* 2229, 1:404; *E. hirae,* 1:404). Per 5 dei 15 ceppi batterici, l'MBC relativa a Agrichlor superava la concentrazione d'uso consigliata: *P. aeruginosa* (1:240) e quattro ceppi di *E. coli* AMR (ceppi 4512, 4536, 2229 MBC 1:255; ceppo 4534 MBC 1:286). Per quattro ceppi di *E. coli* non AMR (4526; 4527; 4529; 4531) la MIC è risultata uguale alla MBC e coincideva al GO. Anche per *E. hirae* la MBC è risultata uguale al GO. Solo *P. vulgaris* e *S. aureus* potevano essere classificati, rispettivamente, come "estremamente sensibile" (MBC 1:1814) e "particolarmente sensibile" (MBC 1:720) ad Agrichlor. Infine, per questo disinfettante si è osservata inoltre la minor variabilità tra valori di MIC e MBC, tanto che solo per *S. aureus* la MBC è risultata doppia rispetto alla MIC.

In sintesi, 9 dei 15 ceppi batterici esaminati hanno manifestato resistenza all'azione battericida per almeno un disinfettante, mentre *E. hirae* e 5 dei 6 ceppi di *E. coli* non AMR (ceppi 25922, 4526, 4527, 4529, 4531) sono stati inibiti da tutti i disinfettanti. *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono risultati sensibili al maggior numero di disinfettanti e resistenti ad un unico presidio (rispettivamente Agrichlor e FAM30).

Tabella 3: profili di resistenza delle diverse specie batteriche ai disinfettati
Table 3. *Resistance profiles of the bacterial strains against disinfectants*

Ceppo batterico	Virkon S	Interkokast	FAM30	Agrichlor	Virocid
Salmonella Enteridits	R	S	R	S	S
Escherichia coli ceppo MSG17 C20	R	S	R	S	S
Escherichia coli ceppo 4534 (AMR)	R	S	R	R	S
Escherichia coli ceppo 4536 (AMR)	R	S	R	R	S
Escherichia coli ceppo 4512 (AMR)	R	S	R	R	S
Escherichia coli ceppo 2229 (AMR)	R	S	R	R	S
Proteus vulgaris	R	S	R	S	S
Staphylococcus aureus	S	S	R	S	S
Enterococcus hirae	S	S	S	S	S
Pseudomonas aeruginosa ceppo 13383	S	S	S	R	S
Escherichia coli ceppo 25922	S	S	S	S	S
Escherichia coli ceppo 4526	S	S	S	S	S
Escherichia coli ceppo 4527	S	S	S	S	S
Escherichia coli ceppo 4529	S	S	S	S	S
Escherichia coli ceppo 4531	S	S	S	S	S

Note: R = valore di MBC>GO (concentrazione d'uso raccomandata); S = valore di MBC≤ GO; (AMR)=antimicrobico-resistente

Confronto delle MIC e MBC tra ceppi di Escherichia coli AMR e non AMR

Sono state valutate le eventuali differenze dei valori di MIC e MBC dei 10 ceppi di *E. coli* esaminati e appartenenti a due diverse categorie: 4 ceppi con profili noti di antibiotico-resistenza e 6 ceppi non AMR). Nonostante tutti i ceppi di *E. coli* venissero inibiti da tutti i disinfettanti a concentrazioni inferiori al loro GO (MIC<GO), solo Interkokast e Virocid avevano un'efficace azione battericida (MBC<GO) nei confronti dei ceppi AMR.
Relativamente a Interkokast, tutti i ceppi di *E. coli* presentavano un valore di MIC e MBC inferiore al GO; tuttavia, i valori di MIC e MBC dei ceppi AMR erano significativamente più elevati (rispettivamente, p=0,014 e p<0,001) rispetto ai ceppi sensibili. Una differenza statisticamente significativa (p<0,001) per i soli valori di MBC è stata osservata anche nell'utilizzo di Virkon, FAM30 e Agrichlor, per i quali i ceppi AMR non solo necessitavano di dosi significativamente più elevate per essere inattivati, ma si sono anche dimostrati resistenti (MBC>GO). Nel caso di Virocid, solo il valore di MIC è risultato significativamente più elevato per i ceppi AMR (p=0,030).

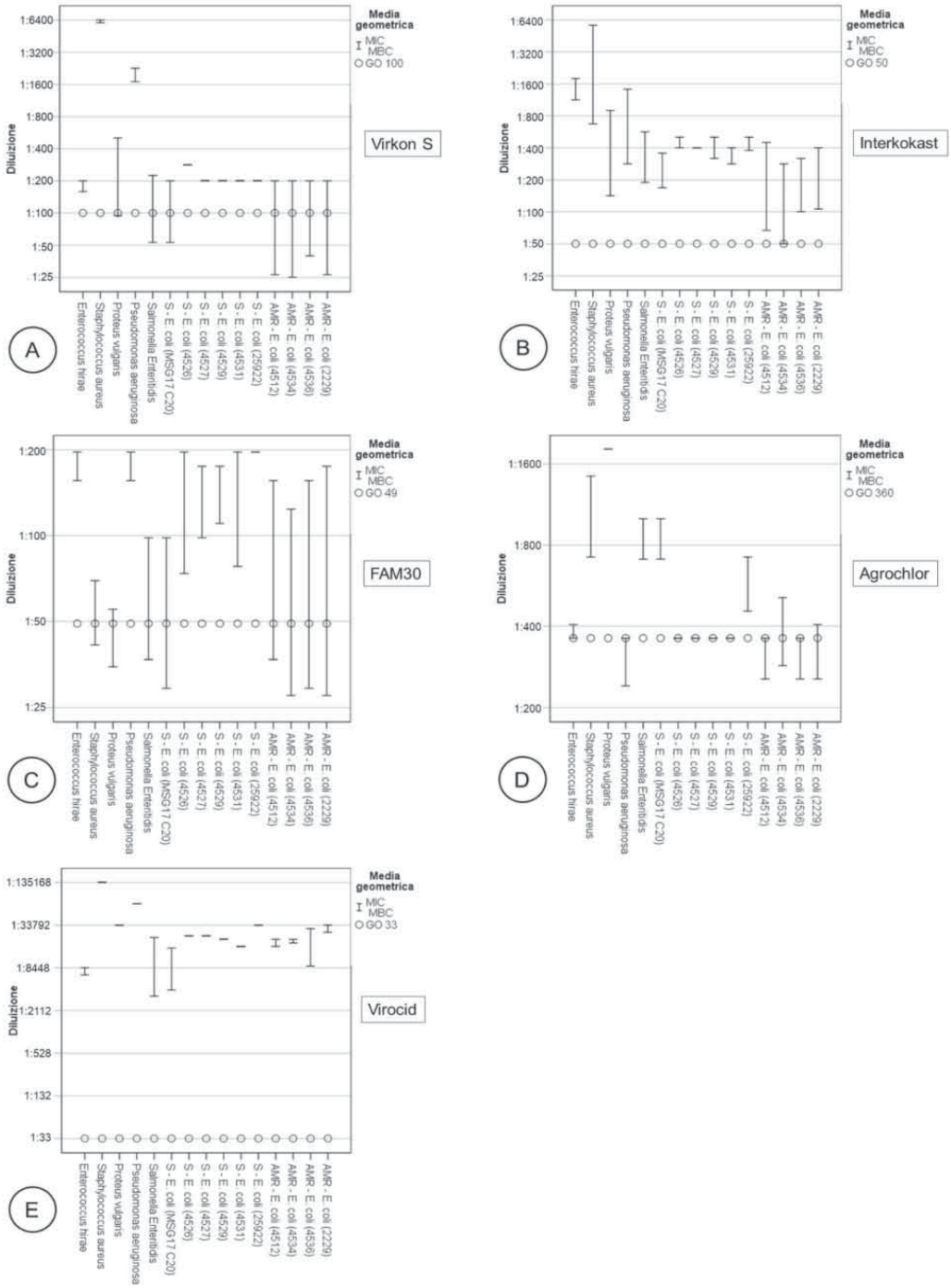


Figura 1: Concentrazione minima inibente (MIC, linea orizzontale superiore) e concentrazione minima battericida (MBC, linea orizzontale inferiore) dei cinque disinfettanti testati

Figure 1. *Minimum inhibitory concentration (MIC, upper whisker) and minimum bactericidal concentration (MBC, lower whisker) of the five disinfectants tested*

DISCUSSIONE

Le corrette procedure di pulizia e disinfezione delle strutture e delle attrezzature sono una componente essenziale di qualsiasi strategia efficace di controllo degli agenti batterici e virali all'interno degli allevamenti suini. Scegliere correttamente i disinfettanti da utilizzare significa conoscere i microrganismi contaminanti presenti in allevamento e la loro sensibilità ai diversi principi attivi (Jiang et al., 2018).

L'obiettivo del presente lavoro è stato quello di verificare *in vitro* l'efficacia di cinque disinfettanti nei confronti di 15 diversi ceppi batterici e di definire non solo se la loro concentrazione d'uso raccomandata (General Order) fosse adeguata, ma anche determinare, sulla base dell'effetto betteriostatico e battericida, la loro efficacia contro alcuni dei batteri di più frequente isolamento negli allevamenti suini. Inoltre, per i ceppi di *E. coli*, è stata valutata l'eventuale associazione tra i le caratteristiche di antibiotico-resistenza e la ridotta sensibilità ai disinfettanti.

In generale, la capacità disinfettante di un qualsiasi antimicrobico non è influenzata solo dal suo meccanismo d'azione, ma anche da altri fattori, tra i quali i più importanti sono la sua concentrazione d'uso, la presenza di materia organica sulle superfici di applicazione e i tempi di contatto (Martelli et al., 2017; McDonnell and Russell, 1999; Ruano et al., 2001).

Uno dei limiti della letteratura disponibile riguardante i disinfettanti è rappresentato dal fatto che molti studi si sono occupati di valutare la loro efficacia nell'ambito dell'industria alimentare oppure in ambiente ospedaliero. Di conseguenza, applicare i risultati di questi studi in un contesto di allevamento risulta difficile e poco significativo (Gradel et al., 2004). Purtroppo, solo pochi Paesi europei, tra cui il Regno Unito, hanno messo a punto metodi ufficiali per la valutazione dei disinfettanti. Tuttavia, si stratta di metodi non armonizzati, e ciò rende difficile il confronto dei risultati.

Con il presente lavoro, si è cercato di incrementare le informazioni disponibili, indagando l'attività di biocidi effettivamente impiegati in ambito veterinario, testando batteri isolati dall'ambiente di diversi allevamenti di suini ed avvalendosi di un metodo che fosse facilmente standardizzabile, quale è la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e battericida (MBC) dei disinfettanti nei confronti di batteri in sospensione in brodocoltura.

Al contrario di quanto accade per gli antibiotici, per i disinfettanti non esistono definizioni di resistenza basate su specifici breakpoints (Chuanchuen et al., 2001; Russell, 2003). Ne consegue che quando si utilizza il termine "resistente" in questo contesto si intende una maggiore tolleranza e una diminuzione della suscettibilità di un determinato microrganismo alla concentrazione di disinfettante in uso e consigliata, al quale era normalmente suscettibile (Kohler et al., 2019; Russell, 2003).

I risultati ottenuti evidenziano come tutti i disinfettanti commerciali esaminati erano in grado di inibire la crescita di tutte le specie batteriche esaminate al valore di concentrazione raccomandato (GO). Tuttavia, nelle procedure di disinfezione, solo l'effetto battericida è di reale interesse (Maris, 1995). In questo studio, l'MBC è stata definita come una riduzione della concentrazione di batteri vitali di almeno 5 logaritmi rispetto alla concentrazione iniziale pre-disinfezione di 10^5 CFU/ml.

Solo Virocid e Interkokast sono risultati efficaci ad una concentrazione pari o inferiore a quella consigliata (GO). Virocid, in particolare, ha espresso sia l'effetto batteriostatico sia l'effetto battericida anche a diluizioni molto elevate, nettamente al di sopra del GO, tanto che il valore di MBC più elevato, osservato nei confronti di *S.* Enteritidis, era comunque 102 volte inferiore alla concentrazione d'uso raccomandata. Interkokast, pur mantenendo la sua attività battericida, per espletarla necessitava di concentrazioni decisamente più alte rispetto a quelle necessarie per inibire buona parte dei batteri, tra cui *S. aureus, P. vulgaris, P. aeruginosa* ed i quattro ceppi di *E. coli* AMR. Inoltre, molto spesso il valore di MIC coincideva con quello di MBC.

I risultati di questo studio confermano quindi l'elevata efficacia nei confronti dei microrganismi

batterici della combinazione QAC/Glutaraldeide ma anche di clorocresolo, già evidenziata in altri lavori sperimentali, anche in presenza di materia organica (Gosling et al., 2016; McLaren et al., 2011).
In contrasto con i due prodotti precedenti, i risultati ottenuti indicano che i disinfettanti meno efficaci *in vitro* sono quelli a base di iodio (FAM30) e a base di potassio perossimonosolfato (Virkon S). L'MBC di FAM30 nei confronti *S. aureus* è risultata superiore alla concentrazione d'uso consigliata, mentre i restanti 7 su 15 ceppi batterici FAM30-resistenti (compresa *S.* Enteritidis) hanno presentato una resistenza associata anche a Virkon S.
Salmonella è un'importante causa di malattia nell'uomo, tanto da essere, in Europa, la seconda zoonosi a trasmissione alimentare (dopo la campylobatteriosi) per numero di casi notificati (EFSA and ECDC, 2021). Parte degli alimenti fonte di infezione è rappresentata da carne suina e la prevalenza negli allevamenti europei da produzione si attesta su valori piuttosto importanti (33,3% di allevamenti da produzione positivi, di cui un 2,2% di positivi per *S.* Enteritidis) (EFSA, 2009). Nonostante la maggior parte dei casi di Salmonellosi umana riconducibili al consumo di carne suina derivi da una contaminazione successiva alla macellazione, rimane importante mantenerne bassa la prevalenza in allevamento, in modo tale da limitare le possibilità di contaminazione (Martelli et al., 2017). Per questi motivi, la resistenza del ceppo di *S.* Enteritidis utilizzato all'azione battericida di FAM30 e di Virkon S genera preoccupazione. Nonostante Payne et al. (2005) avessero attribuito al potassio perossimonosolfato (componente attivo del Virkon S) il più elevato potere disinfettante *in vitro* contro *Salmonella*, numerosi sono gli studi che hanno invece messo in luce la scarsa efficacia di biocidi a meccanismo ossidativo e di quelli a base di iodio, sia *in vitro* che in condizioni che simulano quelle di campo (Gosling et al., 2016; McLaren et al., 2011). Martelli et al. (2017) hanno osservato una contaminazione residua da parte di *Salmonella* quando, per le procedure di pulizia e disinfezione, era stato impiegato un presidio a base di iodio, utilizzato ad una concentrazione anche più elevata rispetto a quella d'uso consigliata.
L'unica resistenza all'inattivazione da parte di *P. aeruginosa* è stata espressa nei confronti di Agrichlor, al quale si sono mostrati resistenti anche i quattro ceppi di *E. coli* AMR. Questo risultato è abbastanza inaspettato, considerando che il NaDCC, componente attivo di Agrichlor, grazie al suo basso peso molecolare riesce ad oltrepassare la membrana fortemente idrofobica di *P. aeruginosa*, responsabile della sua elevata resistenza a molti biocidi (Guerin-Mechin et al., 2004; McDonnell and Russell, 1999). Agrichlor è un disinfettante commerciale, venduto sotto forma di pastiglie effervescenti in acqua. Può essere impiegato sia per la disinfezione delle superfici, ma anche e soprattutto è raccomandato per la disinfezione dell'acqua potabile grazie all'efficacia, alla facilità d'uso e alla stabilità di NaDCC (Fuqua, 2010).
I risultati ottenuti sui restanti batteri testati confermano l'efficacia disinfettante di Agrichlor; tuttavia è importante sottolineare che per *E. hirae* e per la maggioranza dei ceppi sensibili di *E. coli* i valori di MIC e di MBC corrispondevano al GO. Si rende quindi necessario, nell'utilizzo di questo presidio, non diluirlo oltre il valore del GO, dal momento che una concentrazione più bassa potrebbe facilmente scendere al di sotto della soglia di MIC e di MBC.
Sono state messe in evidenza differenze statisticamente significative dei valori di MIC e MBC tra ceppi di *E. coli* antibiotico-sensibili e ceppi con fenotipi noti di antibiotico-resistenza. I ceppi con profili di AMR conosciuta hanno manifestato una ridotta sensibilità ai disinfettanti, la quale si traduceva in un aumento della MIC, della MBC o di entrambe rispetto alle loro controparti antibiotico-sensibili. La possibilità di una cross-resistenza tra antibiotici e disinfettanti è stata già messa in luce precedentemente (Walsh et al., 2011) ed è noto che lo scambio di geni veicolanti resistenza ai disinfettanti e agli antibiotici può avvenire contemporaneamente (co-resistenza) (Gnanadhas et al., 2013; Kim et al., 2018). Nonostante questo, la letteratura a riguardo rimane controversa. Secondo

alcune ricerche, un aumento della MIC di alcuni antibiotici potrebbe essere dovuto ad un'esposizione dei batteri a concentrazioni sub-inibitorie di disinfettanti commerciali (Karatzas et al., 2007; Webber et al., 2015), altri studi invece non hanno rilevato tra questi fenomeni alcuna correlazione (Russell, 2000) o addirittura, in alcuni casi, un'associazione negativa tra l'antimicrobico-resistenza e una ridotta sensibilità ai disinfettanti (Herruzo et al., 2015; Maertens et al., 2019). Tuttavia, il presente studio non aveva l'obiettivo di valutare un'eventuale associazione tra antibiotico-resistenza e riduzione della sensibilità ai disinfettanti. Tuttavia, l'inserimento, tra le popolazioni batteriche testate, anche di ceppi AMR è stato funzionale al verificare l'eventuale presenza di una associazione tra resistenze che sarà approfondita in ricerche successive.
Le metodiche di definizione di MIC e MBC per i batteri in sospensione impiegate in questo studio sono relativamente standardizzabili e permettono di ottenere risultati ripetibili e, per questo motivo, facilmente confrontabili. Tuttavia, i risultati ottenuti devono essere valutati con cautela perché si riferiscono a condizioni *in vitro*. In condizioni di campo sono presenti diversi fattori (es. presenza di materia organica, tipo di materiale delle superfici trattate, temperatura, presenza di biofilm, scarsa pulizia preliminare, scarso tempo di permanenza del disinfettante sulle superfici) che possono influenzare l'efficacia batteriostatica e battericida dei disinfettanti. Inoltre, i batteri in sospensione sono spesso più sensibili all'azione dei disinfettanti rispetto ai batteri presenti su superfici asciutte (Maertens et al., 2019). È stato spesso dimostrato come, in particolare, la presenza di materiale fecale possa inficiare sull'efficacia dei biocidi, anche quando impiegati alle concentrazioni consigliate (McDonnell and Russell, 1999; Ruano et al., 2001; Thomson et al., 2007), tanto che procedure non corrette o non complete di pulizia e di rimozione della materia organica possono annullare l'efficacia dei disinfettanti.

CONCLUSIONI

Questo studio ha evidenziato l'esistenza, *in vitro*, di differenze tra disinfettanti commerciali nella capacità di inibire ed inattivare diverse popolazioni batteriche. È stata inoltre evidenziata una minore sensibilità ai disinfettanti nei ceppi di *E. coli* antibiotico-resistenti, rispetto ai ceppi sensibili. I biocidi maggiormente efficaci sono risultati essere Virocid ed Interkokast, mentre il composto a base di iodio (FAM30) e quello a base di perossimonosolfato (Virkon S) si sono dimostrati i meno efficaci. Va quindi sottolineato che l'efficacia delle operazioni di pulizia e disinfezione nell'allevamento suino è fortemente influenzata dalla scelta del disinfettante che deve essere efficace sui ceppi batterici presenti e impiegato a dosi tali da garantirne l'inattivazione.

BIBLIOGRAFIA

1. Amass, S.F., Vyverberg, B.D., Ragland, D., Dowell, C.A., Anderson, C.D., Stover, J.H., Beaudry, D.J., 2000. Evaluating the efficacy of boot baths in biosecurity protocols. . Swine Health and Production 8, 169-173.
2. Anonimo 2007. The Diseases of Animals (Approved Disinfectants) (England) Order 2007.
3. Bragg, R.R., Meyburgh, C.M., Lee, J.Y., Coetzee, M., 2018. Potential Treatment Options in a Post-antibiotic Era. Adv Exp Med Biol 1052, 51-61.
4. Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R., Schweizer, H.P., 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in Pseudomonas aeruginosa is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob Agents Chemother 45, 428-432.

5. EFSA, 2009. Analysis of the Baseline Survey on the Prevalence of Salmonella in Holdings with Breeding Pigs in the EU, 2008 - Part A: Salmonella Prevalence Estimates. 2009. EFSA Journal 7.
6. EFSA, ECDC, 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA J 19, e06406.
7. Fuqua, G.W., 2010. A Comparative Review of Water Disinfection Methods Appropriate for Developing Countries and their Efficacy, Cost-efficiency, and Usability The University of Texas, School of Public Health, Houston, Texas.
8. Gall, A.M., Shisler, J.L., Marinas, B.J., 2015. Analysis of the viral replication cycle of adenovirus serotype 2 after inactivation by free chlorine. Environ Sci Technol 49, 4584-4590.
9. Gnanadhas, D.P., Marathe, S.A., Chakravortty, D., 2013. Biocides--resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. Expert Opin Investig Drugs 22, 191-206.
10. Gosling, R.J., Breslin, M., Fenner, J., Vaughan, K., West, E., Mawhinney, I., Birch, C., Davies, R.H., 2016. An in-vitro investigation into the efficacy of disinfectants used in the duck industry against Salmonella. Avian Pathol 45, 576-581.
11. Gradel, K.O., Sayers, A.R., Davies, R.H., 2004. Surface disinfection tests with Salmonella and a putative indicator bacterium, mimicking worst-case scenarios in poultry houses. Poult Sci 83, 1636-1643.
12. Guerin-Mechin, L., Leveau, J.Y., Dubois-Brissonnet, F., 2004. Resistance of spheroplasts and whole cells of Pseudomonas aeruginosa to bactericidal activity of various biocides: evidence of the membrane implication. Microbiol Res 159, 51-57.
13. Herruzo, I., Herruzo, R., Vizcaino, M.J., 2015. Is There A Correlation Between Antibiotic Resistance and Decreased Suscepti-bility to Biocides in Different Genus of Bacterial Genera? . Journal of Antibiotics Research 1, 1-7.
14. Jiang, L., Li, M., Tang, J., Zhao, X., Zhang, J., Zhu, H., Yu, X., Li, Y., Feng, T., Zhang, X., 2018. Effect of Different Disinfectants on Bacterial Aerosol Diversity in Poultry Houses. Front Microbiol 9, 2113.
15. Jones, R.D., Jampani, H.B., Newman, J.L., Lee, A.S., 2000. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. Am J Infect Control 28, 184-196.
16. Karatzas, K.A., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J., Humphrey, T.J., 2007. Prolonged treatment of Salmonella enterica serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. J Antimicrob Chemother 60, 947-955.
17. Khan, S., Beattie, T.K., Knapp, C.W., 2016. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. Chemosphere 152, 132-141.
18. Kim, M., Weigand, M.R., Oh, S., Hatt, J.K., Krishnan, R., Tezel, U., Pavlostathis, S.G., Konstantinidis, K.T., 2018. Widely Used Benzalkonium Chloride Disinfectants Can Promote Antibiotic Resistance. Appl Environ Microbiol 84.
19. Kohler, A.T., Rodloff, A.C., Labahn, M., Reinhardt, M., Truyen, U., Speck, S., 2019. Evaluation of disinfectant efficacy against multidrug-resistant bacteria: A comprehensive analysis of different methods. Am J Infect Control 47, 1181-1187.
20. Lambert, P. 2013. Mechanisms of actions of biocides, In: Fraise, A.P., Maillard, J.Y., Sattar, S. (Eds.) Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization. Blackwell, Oxford, UK, 95-107.
21. Lowy, F.D., 2003. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest 111, 1265-1273.
22. Maertens, H., De Reu, K., Meyer, E., Van Coillie, E., Dewulf, J., 2019. Limited

association between disinfectant use and either antibiotic or disinfectant susceptibility of Escherichia coli in both poultry and pig husbandry. BMC Vet Res 15, 310.
23. Maris, P., 1995. Modes of action of disinfectants. Rev Sci Tech 14, 47-55.
24. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F.A., Callaby, R., Rabie, A., Gosling, R.J., Fordon, S., Crocker, G., Davies, R.H., Smith, R.P., 2017. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in Salmonella contaminated pig holdings in the United Kingdom. PLoS One 12, e0178897.
25. McDonnell, G., Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. Clin Microbiol Rev 12, 147-179.
26. McLaren, I., Wales, A., Breslin, M., Davies, R., 2011. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination. Avian Pathol 40, 33-42.
27. Nasr, A.M., Mostafa, M.S., Arnaout, H.H., Elshimy, A.A.A., 2018. The effect of exposure to sub-inhibitory concentrations of hypochlorite and quaternary ammonium compounds on antimicrobial susceptibility of Pseudomonas aeruginosa. Am J Infect Control 46, e57-e63.
28. Punyani, S., Narayana, P., Singh, H., Vasudevan, P., 2006. Iodine based water disinfection: A review. Journal of Scientific and Industrial Research 65, 116-120.
29. Raasch, S., Postma, M., Dewulf, J., Stark, K.D.C., Grosse Beilage, E., 2018. Association between antimicrobial usage, biosecurity measures as well as farm performance in German farrow-to-finish farms. Porcine Health Manag 4, 30.
30. Ruano, M., El-Attrache, J., Villegas, P., 2001. Efficacy comparisons of disinfectants used by the commercial poultry industry. Avian Dis 45, 972-977.
31. Russell, A.D., 2000. Do biocides select for antibiotic resistance? J Pharm Pharmacol 52, 227-233.
32. Russell, A.D., 2003. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. Lancet Infect Dis 3, 794-803.
33. Templeton, M.R., Odddy, F., Leung, W., Rogers, M., 2009. Chlorine and UV disinfection of ampicillin-resistant and trimethoprim-resistant Escherichia coli. Canadian Journal of Civil Engineering 36.
34. Thomson, J.R., Bell, N.A., Rafferty, M., 2007. Efficacy of some disinfectant compounds against porcine bacterial pathogens. . Th Pig Journal 60, 15-25.
35. Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis 11, 355-362.
36. Webber, M.A., Whitehead, R.N., Mount, M., Loman, N.J., Pallen, M.J., Piddock, L.J., 2015. Parallel evolutionary pathways to antibiotic resistance selected by biocide exposure. J Antimicrob Chemother 70, 2241-2248.
37. WHO 2020. Antimicrobial resistance. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance. Consultato il 10 marzo 2021.
38. Wieland, N., Boss, J., Lettmann, S., Fritz, B., Schwaiger, K., Bauer, J., Holzel, C.S., 2017. Susceptibility to disinfectants in antimicrobial-resistant and -susceptible isolates of Escherichia coli, Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from poultry-ESBL/AmpC-phenotype of E. coli is not associated with resistance to a quaternary ammonium compound, DDAC. J Appl Microbiol 122, 1508-1517.

POSTER

EFFETTI POSITIVI DEI BETA GLUCANI DA ALGHE SULLA REPLICAZIONE VIRALE DI PRRSV E ASFV NEI MACROFAGI ALVEOLARI POLMONARI (PAM)

POSITIVE EFFECTS OF ALGAL BETA GLUCAN ON VIRAL REPLICATION OF PRRSV AND ASFV IN PULMONARY ALVEOLAR MACROPHAGES (PAM)

MATTUZZI S.[1], DE LEON A.[2], VAN HAMME V.[1],
NETO R.[1], KIRWAN S.[1]; TAN J.[2], NGUYEN T.[2], THANH H.[3], VU HOANG D.[3]

[1] Kemin Europa N.V., Toekomstlaan 42, 2200 Herentals, Belgium
[2] Kemin Animal Nutrition and Health, Asia Pacific. 12 Senoko Drive, Singapore 758200
[3] Department of Biochemistry and Immunology, National Institute of Veterinary Research, 86 Truong Chinh - Dong Da - Hanoi – Vietnam

Parole chiave: suinetti, Peste suina africana (PSA), PRRS, antivirali, BetaGlucani

ABSTRACT
PRRS and ASF cause huge economic impact for pig producers worldwide and there is a need for additional tools to help control them. Two studies were done to determine the effect of Algal Beta Glucan in the replication of PRRSv and ASFv in PAM cells. Both studies used an in vitro macrophage model, as the virus is macrophage trophic. In the PRRS study, PAM cells were incubated for 1 hour with Algal Beta Glucan at a rate of 0.1, 1, and 10 µm/mL and then challenged with PRRSV strain MN184. The supernatant was collected at different time points (0, 12, 24, and 36 hours after infection) for the determination of viral growth by qRT-PCR. The results showed that the highest concentration of Algal Beta Glucan provided the most reduction in 24 hours and response was dose-dependent. In the ASF study, PAM cells were incubated at different times (15, 30, 60, and 120 mins) and concentrations of Algal Beta Glucan of 10 and 20 µm/mL before being challenged with 106 HAD50/ml ASFv Ha Nam strain. The supernatant was collected at different time points (30 sec, 24h, 48h, 72h, 96h, and 120h) after virus exposure for RT-PCR using OIE protocol. The overall results show suppression of PRRS viral growth as low as 0.1 µm/mL dilution of algae beta-glucan and that 50 µm/mL of Algal Beta Glucan had a significant decrease ($P<0.05$) of Cq value at 24 hours after ASFv exposure in both 1 and 2 hours incubation. These studies have shown the potential effects of algal beta-1,3 glucans on inhibiting or reducing ASFV and PRRS infection in PAM cells.

INTRODUZIONE

Sia la peste suina africana (ASF) che la PRRS sono due dei più importanti virus che colpiscono i suini. Entrambi hanno un impatto drammatico sulla salute e sul benessere e allo stesso tempo abbiamo approcci molto diversi su come controllare le malattie che causano.
Il virus ASF è una malattia virale contagiosa che colpisce suini di tutte le età e origini. Definita una malattia virale emorragica, il virus della peste suina africana è spesso mortale per i maiali domestici infetti, causando una serie di sintomi gravi che vanno dalla febbre e dal vomito a estese emorragie interne.
Il virus della peste suina africana si replica principalmente nei sistemi linfatici e vascolari dei suini infetti. Col tempo, il virus inizia a infiltrare le cellule della milza, dei linfonodi, dei reni, del tratto gastrointestinale e respiratorio, provocando emorragie diffuse. Nei maiali domestici, il periodo di incubazione può variare da 5 a 15 giorni. Gli animali infetti possono iniziare a

rilasciare il virus più di 48 ore prima della comparsa dei sintomi, e i maiali guariti possono continuare a rilasciare il virus fino a un mese dopo la fine dei sintomi. Il virus può diffondersi attraverso tre vie principali: Contatto diretto, contatto indiretto, trasmissione vettoriale tramite artropodi, soprattutto zecche.
In generale, i segni clinici del virus della PSA si presentano in due forme: acuta e cronica. La mortalità è minore nella forma cronica, ma gli altri sintomi sono simili: febbre, diminuzione dell'appetito e perdita di peso, pelle rossa e a chiazze o lesioni cutanee, tosse e difficoltà respiratorie. Attualmente non esiste un vaccino contro il virus della PSA. Sfortunatamente, l'unico modo per evitare che il virus della PSA si diffonda ed entri nella vostra azienda, è quello di assicurare rigidi protocolli di biosicurezza.
La sindrome riproduttiva e respiratoria suina (PRRS) è una malattia che colpisce i suini in tutto il mondo e ha un enorme impatto economico, a causa dei disturbi riproduttivi e del ritardo della crescita. Il virus sta colpendo tutte le categorie di suini, dai suinetti neonatali ai suini da ingrasso alle scrofe gravide. L'impatto finanziario in un'unità d'ingrasso è notevole, ma è anche peggiore in un allevamento da riproduzione. Al momento non esiste una cura per la malattia e la vaccinazione è lo strumento più importante per controllarla. Lo studio in vitro dell›ASFV e della PRRS di solito comporta l›uso di monociti e macrofagi suini per imitare le infezioni virali naturali. Il test di emadsorbimento (HAD) su monociti e macrofagi suini è una delle tecniche utilizzate per il rilevamento e la quantificazione dei campioni di ASFV attraverso la valutazione di un componente strutturale del virione o di un prodotto virale indotto durante l›infezione (de León, 2012).
Ci sono stati diversi studi fatti sul beta-1,3-glucano, estratto da alghe, che mostrano che il beta-1,3-glucano delle alghe innesca proprietà immunomodulanti perché è riconosciuto dai recettori della superficie cellulare, come Dectin-1 sulle cellule immunitarie dei vertebrati, come un pattern molecolare associato al patogeno (Barsanti et al.,2011; Levine et al., 2018; Barsanti e Gualtieri, 2019). Il legame del beta-1,3-glucano delle alghe ai macrofagi e alle cellule dendritiche avvia una cascata di segnali che si traduce in un aumento dei tassi di fagocitosi e presentazione dell›antigene, produzione di specie reattive dell›ossigeno e secrezione di citochine e chemochine (Levine et al., 2018; Barsanti et al.,2011). Essendo i macrofagi il sito primario di replicazione sia della PSA che della PRRS con conseguente modulazione immunitaria da parte del virus, l›obiettivo di questi studi era di valutare se il beta-1,3-glucano delle alghe fosse in grado di aiutare a diminuire la propagazione dei virus nelle cellule PAM.

MATERIALI E METODI

Studio 1: impatto del Beta 1,3 Glucano, estratto dalle alghe, sull'infezione da virus PRRS

Per valutare l'impatto del Beta 1,3 Glucano sull'infezione da virus PRRS dei macrofagi in vitro, è stato utilizzato un modello di macrofagi in vitro per testare l'effetto di Aleta™ contro il virus PRRS. I macrofagi alveolari suini (PAM) sono stati coltivati per una notte a 37°C e 5% CO_2. I riceventi (pozzetti e provette) sono stati seminati con PAM a una concentrazione di $2{,}5x10^5$. Per lo studio che valuta l'impatto del Beta 1,3 Glucano contro la PRRS, le cellule sono state trattate con diverse concentrazioni di beta-glucano derivato dalle alghe (da 10 µm/mL a 0,01 µm/mL), diluite in un terreno specifico contenente FBS durante 1 ora a 37°C e 5% CO_2. Le cellule sono state infettate (tranne il controllo negativo) con il ceppo PRRSV MN184 per la durata di 1 ora a 37°C e 5% CO_2.
Il surnatante è stato raccolto in diversi momenti (0, 12, 24 e 36 ore dopo l'infezione) per determinare la crescita virale tramite qRT-PCR. La prova è stata replicata 3 volte e i risultati sono la media dei 3 replicati.

L'effetto del beta-glucano delle alghe sull'infezione dei macrofagi da parte del virus PRRS è stato valutato mediante citometria a flusso. Le cellule nelle provette sono state colorate in modo fluorescente, a 12 ore dall'infezione, con il marcatore dei macrofagi SWC3 e con l'anticorpo monoclonale SR30F per il nucleocapside intracellulare del virus PRRS (= genoma + rivestimento proteico di un virus). I campioni colorati sono stati fatti passare attraverso il citometro a flusso e i nucleocapside del virus sono stati misurati usando un conteggio di 10.000 cellule con selezione cellulare attivata dalla fluorescenza (FACS).

Studio 2: effetto del beta-1,3 glucano estratto dalle alghe sulla propagazione dell'ASF

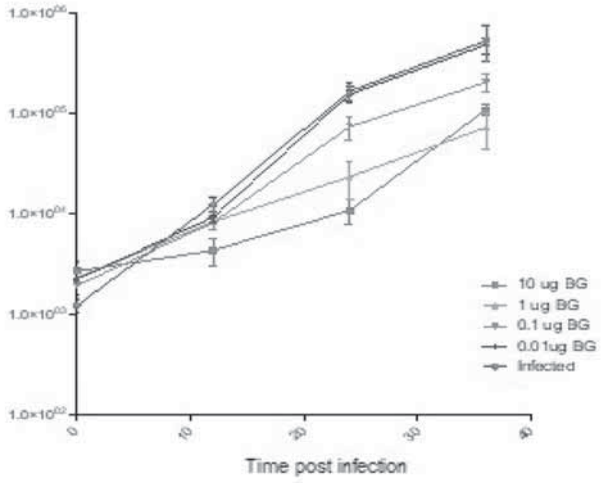
Per valutare l'effetto del beta-1,3 glucano, estratto dalle alghe, sulla propagazione dell'ASF mediante PCR in tempo reale, le cellule PAM sono state trattate con due livelli di beta-1,3 glucano estratto dalle alghe (10 e 50 microgrammi/ml) e sono state incubate per tempi diversi: 15 minuti, 30 minuti, 60 minuti e 120 minuti. Le cellule PAM trattate con il beta-1,3 glucano estratto dalle alghe sono state inoculate con l'esposizione al virus della PSA a 103 HAD50/ml. Tre campioni sono stati poi raccolti a 30 s, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h dopo l'esposizione al virus per la PCR in tempo reale per ogni tempo di esposizione al beta-1,3 glucano estratto dalle alghe. La PCR in tempo reale ha utilizzato il protocollo OIE per la quantificazione del virus della PSA. I controlli negativi e positivi sono stati inclusi nella prova, rappresentati rispettivamente da cellule PAM non trattate con beta-1,3 glucano ed esposte e non esposte al virus della PSA,.

RISULTATI

Studio 1 impatto di Beta 1,3 Glucano sull'infezione da virus PRRS

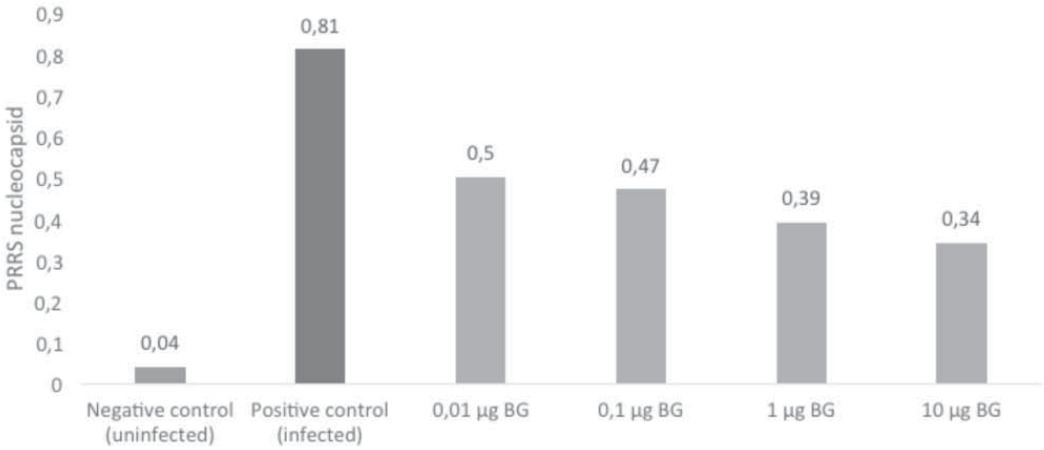
L'aggiunta di beta-glucano d'alga nel sistema di coltura ha mostrato una riduzione della crescita del virus PRRS. Le concentrazioni più alte di beta-glucano d'alga hanno fornito la maggiore riduzione a 24 ore. Una riduzione dose-dipendente della crescita virale è stata raggiunta in modo coerente ad ogni punto temporale. I risultati complessivi mostrano la soppressione della crescita virale a partire da una diluizione di 0,1 µm/mL di beta-glucano estratto dalle alghe. I risultati possono essere visti nella figura 1.

Figura 1. Crescita virale di PRRSV a varie diluizioni di beta-glucano da alghe per mL, media su 3 repliche ± errore standard.



Il beta-glucano estratto dalle alghe ha anche mostrato un'inibizione dipendente dalla dose dell'infezione virale dei macrofagi. L'infezione è stata soppressa alla dose più bassa di 0,01 µg di beta-glucano per mL, i risultati possono essere visti nella figura 2.

Figura. 2. Effetto del beta-glucano delle alghe sull'infezione da PRRSV delle PAM

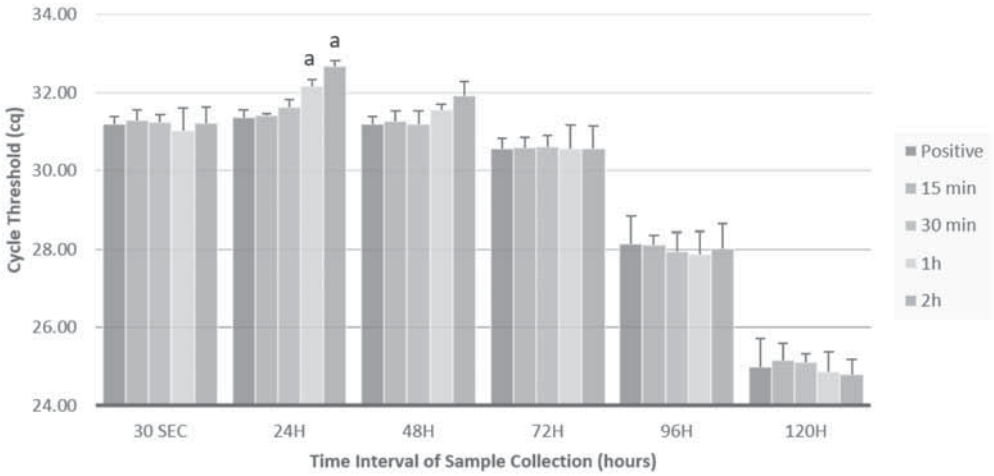


Studio 2: effetto del Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe sulla propagazione dell'ASF

I risultati hanno mostrato che l'effetto di 50 µm/mL di beta-glucano derivante da alghe hanno comportato una diminuzione significativa (P<0.05) del valore Cq a 24 ore, dopo l'esposizione all'ASF, sia dopo 1 che dopo 2 ore di incubazione. I risultati possono essere visti nella figura 3.

Algae beta-1,3 glucan a 50 micrograms/ml

Figura 3. Effetto in vitro del Beta-1,3 Glucano algale su ASFv. Values in a row with superscripts differ significantly (P<0.05)



DISCUSSIONE

In entrambe le prove, Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe ha mostrato un'inibizione dose-dipendente dell'infezione virale e della replicazione nelle cellule PAM. La capacità di Beta-1,3 Glucano estratto dalle alghe di potenziare i meccanismi di difesa dall'infezione e contemporaneamente aumentare la secrezione di IL-10 (Russo et al., 2017) può spiegare l'azione di questi glucani nell'inibire la propagazione dei virus PRRS e ASF nelle cellule PAM. Beta-1,3 Glucani sono potenzialmente uno strumento utile per una migliore protezione degli allevamenti suini da PRRS e ASF, attraverso un ipotetico effetto diretto sulla replicazione virale.

CONCLUSIONE

Questi studi hanno mostrato i potenziali effetti dei beta-1,3 glucani, estratti dalle alghe, sull'inibizione o la riduzione dell'infezione da ASFV e PRRS nelle cellule PAM.

BIBLIOGRAFIA

1. Barsanti L, Vismara R, Passarelli V, and Gualtieri P. 2011.Paramylon (β-1,3-glucan) content in wild type and WZSL mu-tant of Euglena gracilis. Effects of growth conditions. J. Appl.Phycol. 13:59–65.
2. Barsanti L and Gualtieri P. 2019. Paramylon, a Potent Immunomodulator from WZSL Mutant of Euglena gracilis. Molecules. Sep; 24(17):3114
3. Levine R, Horst G, Tonda R, Lumpkins and Mathis G. 2018. Evaluation of the effects of feeding dried algae containing beta-1,3-glucan on broilers challenged with Eimeria Poultry Science. 97:3494–500 - http://dx.doi.org/10.3382/ps/pey227
4. de León, P., MJ Bustos, AL Carrascosa.2012. Laboratory methods to study African swine fever virus. Virus Res. (2012), http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2012.09.013
5. TL-20-18183
6. SD-21-24254

UTILIZZO DI ACIDO FORMICO INCAPSULATO, ACIDO CITRICO, AROMI FUNZIONALI E BACILLUS SP. PB6 IN UNA DIETA PREMIUM PER SVEZZARE CON SUCCESSO I PICCOLI SUINETTI SENZA MEDICAZIONE CON OSSIDO DI ZINCO

USING ENCAPSULATED FORMIC ACID, CITRIC ACID, AND FUNCTIONAL FLAVOURS AND BACILLUS SP. PB6 IN A PREMIUM DIET TO SUCCESSFULLY WEAN SMALL PIGLETS WITHOUT MEDICAL ZINC OXIDE

MATTUZZI S.[1], BUKOWSKA P. [1], VAN HAMME V. [1], GUETTA N.[1], CARLSON D.[2]

[1] *Kemin Europa N.V.,* [2]*SvineRaadgivningen (Danish Pig Advisory Center)*

Parole chiave: Suinetto, svezzamento, diarrea

ABSTRACT

Weaning is one of the main challenges in the piglets life. It combines changes in local protection, caused by sudden withdrawal of maternal milk with IgA´s, declining immunity against pathogens to which will be exposed after weaning, changes in the intestinal tract (structural and functional) to adapt to a new different diet, insufficient stomach acidification and inability to fully use the nutrients available in the diet immediately after weaning. All these challenges often lead to post weaning diarrheas. Currently pig veterinarians rely on antibiotic treatments during the post weaning period and on Zinc Oxide at higher doses included in the post weaning diets. Due to concerns about the accumulation of Zn in the environment and the potential to the development of antibiotic resistance due to the use of ZnO and metaphylactic or prophylactic antibiotic use Vahjen et al (2015), ZnO at higher than the physiological required is being banned from June 2022 and new restrictions on the use of antimicrobials also came in place in January 2022.

It is important to find alternatives to support piglets during the post weaning period and tools to help controlling post weaning diarrhea. Probiotics have proved to be potential alternatives to antibiotics to prevent diarrhea and support good performance, Rist et al (2013).

The objective of this study was to assess a premium medical ZnO free diet formulated with encapsulated formic acid, citric acid, and functional flavours (FormaXOL™) and *Bacillus* sp PB6 (CLOSTAT®) in comparison to a standard diet containing a high dose of ZnO. Diarrhoea score was comparable between the diet containing medical doses of ZnO and the diet reformulated with encapsulated formic acid, citric acid, and functional flavours and *Bacillus* sp PB6.

FCR was significantly improved during the first 14 days after weaning, and during the overall post weaning period with the diet reformulated with encapsulated formic acid, citric acid, and functional flavours and *Bacillus* sp PB6 compared to the diet containing medical ZnO. Piglets having a small body weight at weaning particularly benefited from the diet reformulated with formic acid, citric acid, and functional flavours and *Bacillus* sp PB6.

INTRODUZIONE

L'ossido di zinco (ZnO) usato a dosi mediche nelle diete dei suinetti svezzati sarà gradualmente eliminato nell'Unione europea entro giugno 2022. Poiché questa scadenza si sta avvicinando velocemente, la necessità di sviluppare strategie di successo per sostituire le alte dosi di ZnO si fa sentire. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di una dieta priva di ZnO (formulata con acido formico incapsulato, acido citrico, aromi funzionali incapsulati e con Bacillus sp. PB6) rispetto a una dieta standard contenente una dose elevata di ZnO. Nello studio sono stati utilizzati suinetti svezzati con un peso medio di 4,15 kg. Sono stati monitorati e registrati i dati in merito all'insorgenza di diarrea, all'uso di farmaci e alle prestazioni post-svezzamento. Lo studio è stato condotto in Danimarca da TestPig, presso la stazione di prova di Skjoldborg. Le diete mediche prive di ZnO sono state formulate dai nutrizionisti del Danish Pig Advisory Service, con particolare attenzione al tenore in proteina e alla digeribilità complessiva dei nutrienti.

MATERIALI E METODI

Tutti i suinetti sono stati tenuti, per i primi 14 giorni dopo lo svezzamento, in stanze di cura speciali (stanze BabyPig) poiché avevano un peso corporeo medio di circa 4 kg. Dopo questo periodo, i suinetti sono stati spostati nelle sale da svezzamento standard, dove sono stati tenuti per altre quattro settimane. La durata totale della prova è stata di 43 giorni e la prova è terminata il 10 agosto 2021.

Prodotti testati durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento (1-14 giorni)

Una dieta commerciale standard è stata usata come dieta di controllo. Questa dieta conteneva 3000 ppm di ossido di zinco, 0,5% di formiato di calcio invece di calcio carbonato (CaCO3) e 0,5 % di acido benzoico.

Il mangime per il test era un nuovo mangime, formulato dal Danish Pig Advisory Service (Servizio di consulenza per i suini danese). Nella formula della dieta riformulata, il contenuto proteico è stato mantenuto basso (161 g di proteine digeribili per kg) e il contenuto di aminoacidi è stato aumentato del 14-18% rispetto alle raccomandazioni standard. La dieta in prova è stata integrata con 4 kg/t di acido formico incapsulato, acido citrico e aromi funzionali (FormaXOL) e 750 g/t di Bacillus sp. PB6 (CLOSTAT XCL (4×10^8 CFU/g)). Anche l'acido benzoico e il formiato di calcio sono stati utilizzati a un livello di dose simile a quello della dieta standard (0,5% per ciascun prodotto). Inoltre, una miscela di acidi organici è stata fornita nell'acqua potabile dei suinetti alimentati con la dieta riformulata. Questi maialini hanno anche ricevuto chelati organici di ferro e zinco, e un'alta quantità di vitamine e plasma in polvere.

Tutti i suinetti hanno avuto accesso ad libitum al mangime secco e il mangime bagnato è stato somministrato quattro volte durante il giorno (dalle 7 alle 15) e una volta durante la sera (dalle 20 alle 23). I dettagli sulla composizione delle diete, sia di controllo che le riformulate, sono riportati nell'appendice 1.

Le composizioni delle diete durante il test erano sconosciute al personale della stazione di prova.

Animali e misure durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento (1-14 giorni)

Un totale di 1072 suinetti, svezzati a 25 ± 3 giorni di età, sono stati utilizzati nello studio. Nel gruppo di controllo, 538 suinetti (4,2 ± 0,5 kg) sono stati nutriti con la dieta standard. Nel gruppo di prova, 534 suinetti (4,1 ± 0,5 kg) sono stati alimentati con la

dieta riformulata contenente acido formico e acido citrico incapsulato, aromi funzionali e Bacillus sp PB6. I suinetti sono stati assegnati a un totale di 40 box (20 box in ogni gruppo) contenenti circa 27 suinetti ciascuno. I recinti erano dotati di un "nido" per suinetti e di un'area di attività a doghe.
Sono stati monitorati l'assunzione di mangime (FI), il guadagno medio giornaliero (ADG), il rapporto di conversione del mangime (FCR, Kg FI/kg di aumento di peso), la mortalità e i trattamenti medici. L'unità sperimentale era il capannone.
Il numero di giorni in cui 0/3, 1/3, 2/3 o 3/3 dei suinetti in ogni box avevano presentato diarrea è stato registrato durante l'intero studio. Questo sistema di punteggio si è basato su una valutazione visiva giornaliera della qualità delle feci, per valutare la prevalenza della diarrea in ogni gruppo sperimentale.

Animali e misure dopo i primi 14 giorni dallo svezzamento (14-43 giorni)
Dopo il primo periodo di 14 giorni, tutti i suinetti svezzati sono stati spostati in una stanza di svezzamento standard, dove sono stati alimentati con le rispettive diete per 3 giorni e gradualmente passati (controllati automaticamente) a una dieta di svezzamento standard per un ulteriore periodo di 29 giorni. Le caratteristiche nutrizionali delle diete somministrate durante questo periodo sono riportate nell'appendice 2.
I suinetti sono stati distribuiti in 8 stanze simili con i loro compagni di box del primo periodo sperimentale. In ogni stanza sono stati utilizzati 2 box doppi. FI, ADG, FCR e mortalità sono stati registrati e l'unità sperimentale era la stanza.

Analisi statistica
I dati sulle prestazioni degli animali (ADG, FI e FCR) sono stati analizzati con la procedura GLM utilizzando R con un modello a effetti misti che includeva il peso corporeo iniziale (BW) al giorno 0, il numero di lotti settimanali, la dieta e le interazioni tra BW e dieta. I dati del punteggio fecale sono stati analizzati con un modello di regressione di Poisson.

RESULTATI E DISCUSSIONE

Salute e medicazione dei suinetti durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento (1-14 giorni)
Nel complesso, i suinetti di entrambi i gruppi sperimentali hanno avuto uno stato di salute molto buono durante il periodo di prova. Per quanto riguarda la diarrea, solo un suinetto del gruppo alimentato con la dieta riformulata senza ZnO ha dovuto essere trattato con iniezioni di trimetoprim e sulfadoxina per 3 giorni consecutivi. Nessun suinetto ha avuto bisogno di un trattamento per la diarrea nel gruppo alimentato con la dieta contenente ZnO. L'insorgenza di diarrea in entrambi i gruppi è stata molto bassa rispetto ai risultati storici dell'allevamento di prova.

Diarrea durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento (1-14 giorni)
Il numero medio di giorni con segni di diarrea nelle feci visibili nei recinti per ogni gruppo sperimentale è presentato nella tabella 1. Nel complesso, la presenza di diarrea è stata bassa e non è stata osservata alcuna differenza significativa tra i due gruppi sperimentali. Il numero medio di giorni con 1/3 di diarrea nelle feci della dieta ZnO e riformulata era 0,9 e 1,7 rispettivamente ($P > 0,05$). Il numero medio di giorni con 2/3 di diarrea nelle feci dello ZnO e della dieta riformulata era 0,1 e 0,4 rispettivamente ($P > 0,05$).

Tabella 1: Numero medio di giorni con segni di diarrea in 1/3, 2/3 o 3/3 delle feci nei primi 14 giorni dopo lo svezzamento
Table 1: Average number of days with signs of diarrhea in 1/3, 2/3 or 3/3 of the feces first 14 days after weaning

	ZnO diet	Dieta riformulata (acido formico e acido citrico incapsulati e aromi funzionali e Bacillus sp PB6)	P-value
Giorni con 1/3 di diarrea	0.9	1.7	0.25
Giorni con 2/3 di diarrea	0.1	0.4	0.30
Giorni con 3/3 di diarrea	0	0	-

Risultati della performance di crescita durante lo studio (1-14, 14-43 e 1-43 giorni)

I risultati delle prestazioni di crescita ottenuti durante i diversi periodi sperimentali e durante l'intero periodo di studio sono riportati nella tabella 2.
Durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento, i suinetti nutriti con la dieta riformulata con acido formico e acido citrico incapsulati, e aromi funzionali e Bacillus sp PB6 avevano un ADG numericamente più alto (+ 14,4%) e un FCR significativamente ridotto (- 7,3%, P < 0,05) rispetto ai loro compagni nella dose medica di ZnO. Il livello di energia nella dieta di controllo era del 2,3% superiore a quello della dieta di prova premium. Tenendo conto di questa differenza, l'FCR calcolato sul contenuto energetico del mangime era del 9,2% inferiore per il gruppo che riceveva il mangime di prova rispetto al gruppo di controllo (1,78 e 1,96 rispettivamente, P < 0,01).
ADG, FI e FCR erano simili tra i due gruppi durante il periodo 14-43 giorni (P > 0,05), il che è in linea con il fatto che i suinetti hanno ricevuto la stessa dieta post-svezzamento prodotta nell'azienda di prova durante questo periodo.
Considerando il periodo totale di studio di 1-43 giorni, FCR è stato significativamente ridotto (- 4.2%, P <0.05) per i suinetti il gruppo di prova rispetto a quelli nel gruppo ZnO medico. Questi risultati indicano che i buoni risultati dati dal trattamento dietetico durante i primi 14 giorni hanno fornito benefici a lungo termine per i suinetti, che si riflette in tutto il periodo post-svezzamento.

Tabella 2: Performance di crescita dei suinetti durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento e durante tutto il periodo sperimentale
Table 2: Piglets growth performance during the first 14 days after weaning and during the overall experimental period

		Gruppo sperimentale		P-values		LSD
	Giorno	Dieta ZnO	Dieta riformulata (acido formico e acido citrico incapsulati e aromi funzionali e Bacillus sp PB6)	Dieta	BW x dieta	
Peso vivo (BW)						
Peso vivo iniziale (kg/pig)y	1	4.2 (±0.5)	4.1 (±0.6)	na	na	na
Peso vivo intermedio (kg/pig)y	14	6.6 (±0.8)	6.9 (±0.8)	na	na	na
Peso vivo finale (kg/pig)y	43	22.8 (±1.8)	22.6 (±2.0)	na	na	na
1-14 giorni dopo lo svezzamento						
ADG (g/d/pig)x	1-14	173	198	0.13	0.007	37
FI (g/d/pig)x	1-14	265	275	0.53	ns	36
FCRx	1-14	1.51	1.40	0.03	<0.001	0.16
14-43 giorni dopo lo svezzamento						
ADG (g/d/pig)x	14-43	549	533	0.5	ns	57
FI (g/d/pig)x	14-43	820	741	0.25	ns	80
FCRx	14-43	1.43	1.38	0.21	ns	0.09
1-43 giorni dopo lo svezzamento						
ADG (g/d/pig)x	1-43	427	424	0.85	ns	38
FI (g/d/pig)x	1-43	620	599	0.32	ns	49
FCRx	1-43	1.44	1.38	0.03	ns	0.07

y: indica ± SD (n=20), x: indica ± SD (n=20), na: non analizzato, ns: non significativo

L'analisi statistica ha mostrato un'interazione tra il peso vivo e la dieta per la FCR durante i primi 14 giorni. Ciò ha indicato che in questa prova, il suinetto più piccolo (<4 kg) ha utilizzato in modo più efficiente la dieta contenente acido formico e acido citrico incapsulati, con aromi funzionali e Bacillus sp PB6 rispetto alla dieta medicata con ZnO.
La mortalità è stata dell'1,5% in entrambi i gruppi sperimentali, durante l'intero periodo di prova (1-43 giorni dopo lo svezzamento). Nel periodo dei primi 14 giorni, la percentuale di malattia

è stata pari a 1,1% nel gruppo alimentato con la dieta medicata con ZnO mentre dell'1,9% nel gruppo di prova.

Follow up dei test sul campo

Per confermare i risultati di questa prova sperimentale, il rendimento della dieta contenente acido formico e acido citrico incapsulati, aromi funzionali e Bacillus sp PB6 è stato valutato qualitativamente in tre allevamenti commerciali in Danimarca per 14 giorni dopo lo svezzamento (in totale 400 suini, 120 suini e 250 suini ciascuno). Durante le tre valutazioni, la dieta riformulata ha avuto prestazioni simili o migliori delle diete di controllo contenenti ZnO medico.

CONCLUSIONI

Trovare alternative adeguate alla medicazione con ZnO è una grande sfida, soprattutto quando la necessità è quella di sostenere i piccoli suinetti nella fase dello svezzamento, dove è noto che beneficiano maggiormente dell'integrazione di ZnO. Con questa prova, riformulando una dieta premium con l'integrazione di acido formico e acido citrico incapsulati, con aromi funzionali e Bacillus sp PB6, ha dimostrato di essere una strategia eccellente per aiutare con successo i suientti e garantire lo svezzamento senza ZnO, mantenendo lo stato di salute e assicurando ottime performance di crescita.

APPENDICE 1:

Tabella 3: Composizione della dieta somministrata durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento.
Table 3: *Feed composition of the diet given during the first 14 days after weaning.*

Dieta riformulata

Ingredienti della dieta riformulata (Test)	%
Orzo (trattato termicamente)	13.5
Frumento (gelatinizzato)	52.8
Latte in polvere	16
Arbocel	1.5
Proteina di soia AX3 Digest	5
Polvere di plasma	5
Fosfato monocalcico	1.29
Grasso	1
L-Lisina	0.764
DL-metionina	0.271
L-treonina	0.294
DL-triptofano	0.082
L-valina	0.132
Formiato di calcio	0.5
Acido benzoico	0.5
FormaXOL	0.4
CLOSTAT	0.075
Aroma Luctarom Advance	0.1
Chelato di ferro di aminoacido	0.071
Chelato di zinco di aminoacido	0.118
Premix + SR Elite Blanding	0.575
Energia del mangime, per kg	1.27

Dieta di controllo

Ingredienti della dieta medicata con ZnO (Controllo)	%
Grano (il 20% del grano è stato trattato termicamente)	44.3
Mais, fiocchi	3.0
Latte in polvere	18.0
Lattosio in polvere	9.1
Concentrato di proteine di soia	10.0
Proteina di patata	7.0
Grasso	2.7
Acido benzoico	0.5
Formiato di calcio	0.5
Zinc Oxide premix	0.3
Minerali, vitamine, aminoacidi ecc.	4.6
Energia del mangime, per kg	1.30

Tabella 4: Caratteristiche nutrizionali della dieta riformulata (dieta senza ZnO) somministrata durante i primi 14 giorni dopo lo svezzamento
Table 4: *Nutritional characteristics of the reformulated (ZnO free diet given) during the first 14 days after weaning*

Caratteristiche nutrizionali	%
Sostanza secca	92.35
Proteina grezza	17.91
Grasso grezzo	5.9
Cenere grezza	5.09
Fibra	3.44
Amido	39.6
Lattosio	6.4
Macroelementi	**%**
Calcio	6.94
Fosforo	6.87
Sodio	3.25
Amminoacidi	‰
Proteina Dig	161.33
Dig lisina	14.99
Dig Metionina	4.93
Dig Met+Cyst	8.2
Dig Threo	9.24
Dig Tryp	3.46
Dig Isoleu	6.23
Dig Val	9.27

APPENDICE 2: COMPOSIZIONE DEGLI ALIMENTI DELLE DIETE STANDARD PER LO SVEZZAMENTO

Tabella 5: Ingredienti del mangime (%) nella dieta dello starter 6-9 kg
Table 5: *Feed ingredients (%) in the starter diet 6-9 kg*

Ingrediente	**(%)**
Frumento	65
Farina di pesce	6.5
Olio di soia	2.4
Premix(1)	26.1

Contenente proteine della soia, della patata e del latte, vitamine, minerali, aminoacidi, fitasi, antiossidanti, xilanasi e acidi organici

Tabella 6: Ingredienti del mangime (%) nella dieta iniziale 9-15 kg
Table 6: *Feed ingredients (%) in the starter diet 9-15 kg*

Ingrediente	**(%)**
Frumento	61.1
Orzo	10
Farina di soia	10
Olio di soia	135
Soia alfa	10.1
Premix (1)	7.3

Contenente proteine di patate, vitamine, minerali, aminoacidi, fitasi, antiossidanti e acidi organici

Tabella 7: Ingredienti del mangime (%) nella dieta dello starter 15-30 kg
Table 7: *Feed ingredients (%) in the starter diet 15-30 kg*

Ingrediente	**(%)**
Frumento	41.3
Orzo	25
Farina di soia	26.9
Olio di soia	1.7
Premix	5.1

Contenente proteine di patate, vitamine, minerali, aminoacidi, fitasi, antiossidanti e acidi organici

BIBLIOGRAFIA

1. Vahjen, W., Pietruszyńska, D., Starke, I. C. & Zentek, J. High dietary zinc supplementation increases the occurrence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in the intestine of weaned pigs. *Gut Pathog.* **7,** 23 (2015).
2. Rist, V. T. S., Weiss, E., Eklund, M. & Mosenthin, R. Impact of dietary protein on microbiota composition and activity in the gastrointestinal tract of piglets in relation to gut health: a review. *animal* **7,** 1067–1078 (2013).

TRACCIABILITÀ DIGITALE ED ACQUISIZIONE DATI NEL SUINO: INDAGINI PRELIMINARI

DIGITAL TRACEABILITY AND DATA ACQUISITION IN PIGS: PRELIMINARY INVESTIGATIONS

DI GIUSEPPE P.[1], HATTAB J.[2], GABRIELLI L.[3], MARRUCHELLA G.[2], ODINTSOV VAINTRUB M.[1]

[1]*Regrowth srls, 64100, Teramo;*
[2]*Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano d'Accio, 64100, Teramo;*
[3]*Medico Veterinario, 63073, Offida, Ascoli Piceno*

Parole chiave: identificazione elettronica, zootecnia di precisione
Keywords: electronic identification, precision livestock farming

RIASSUNTO
Il progresso tecnologico sta fornendo una serie di strumenti utili per una gestione più razionale delle produzioni animali, il che risponde a specifiche esigenze zootecniche, sanitarie, etiche e di *marketing*. Il presente studio ha avuto l'obiettivo di abbinare un sistema di identificazione individuale elettronica alla misurazione del peso dei suini, al fine di calcolare in modo preciso e continuo l'incremento ponderale giornaliero di ogni singolo soggetto. Sinteticamente, il sistema era composto dai seguenti componenti: 1) stazione di rilevamento dati; 2) unità di gestione dati e comunicazione; 3) un *server* esterno (Cloud) ed un *software* (WebApp). La tecnologia sviluppata è stata in grado di tracciare individualmente i suini e di rilevarne adeguatamente il peso. L'esperienza maturata indica che la tracciabilità dei suini e l'acquisizione digitale di dati utili è possibile, a costi già piuttosto contenuti, anche laddove sia richiesto il superamento di barriere infrastrutturali e tecnologiche.

ABSTRACT
Technological progress is providing several useful tools for "precision livestock farming", which fulfills specific zootechnical, health, ethical and marketing needs. The present study aimed to combine an individual electronic identification system with the measurement of the weight of pigs, in order to accurately calculate the daily weight gain of each animal. Briefly, the system consisted of the following components: 1) data detection unit; 2) data management and communication unit; 3) external server (Cloud) and software (WebApp). The developed technology was able to individually track each pig and to properly measure their body weight. The experience gained herein indicates that the traceability of pigs and the digital acquisition of useful data is possible at quite low costs, even when the overcoming of infrastructural and technological issues is required.

INTRODUZIONE
L'intensificazione delle produzioni zootecniche ha aumentato a dismisura il rapporto numerico fra animali allevati e personale addetto alla loro gestione. Nella suinicoltura moderna, ogni componente dello staff aziendale è mediamente "responsabile" della gestione di 3000-6000 suini. Ovviamente, ciò impedisce il controllo individuale degli animali allevati: condizioni di salute, prestazioni zootecniche, stato di benessere (Hemsworthlt et al. 1993; Canali, 2014; Norton et al., 2019). Con la definizione generica "*precision livestock farming*" (PLF) si fa riferimento all'insieme delle tecnologie utilizzate per migliorare il *management* aziendale, attraverso la raccolta e l'analisi

di dati. Le tecnologie PLF sono solitamente composte da due componenti: a) un sensore, in grado di rilevare dati in modo continuo in stalla; b) un *software* che presiede alla trasmissione ed elaborazione dei dati. In suinicoltura, alcune tecnologie PLF sono già potenzialmente disponibili, ad esempio per monitorare l'andamento clinico delle patologie respiratorie o per fornire a ciascun animale la razione ideale (Gomez et al, 2021). Ciononostante, la loro applicazione in campo è spesso condizionata negativamente dalla difficoltà di adattare allo scopo le infrastrutture fisse disponibili (Berkmans, 2015). Ad esempio, in Italia l'impiego di strumenti PLF coinvolge solo il 38% degli allevamenti, in netta prevalenza nel settore dei bovini da latte (ISTAT, 2021). Anche l'impiego di sistemi di identificazione elettronica (*tag* auricolari elettronici, TAE) è poco comune nella specie suina, a causa del costo relativamente elevato e della necessità di disporre di lettori adatti (Madec et al, 2001).
Ciò premesso, lo studio di seguito riportato ha avuto l'obiettivo di abbinare un sistema di identificazione individuale elettronica (TAE) alla misurazione del peso di suini, al fine di calcolare in modo preciso e continuo l'incremento ponderale giornaliero di ogni singolo soggetto.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata svolta in un box già esistente, costituito da uno spazio interno riscaldato e da uno spazio esterno dotato di abbeveratoi e mangiatoie. I due spazi sono collegati da un passaggio obbligato di dimensioni ridotte. L'allevamento non è dotato di connessione internet via cavo o GSM ed il suo posizionamento geografico consente una connessione limitata alla rete con capacità dati 2G-3G.
Sono stati oggetto di studio 12 suini, ognuno dei quali è stato identificato con un TAE (Spiessl-Mayr et al., 2005) e tracciato per 3 settimane consecutive. Il TAE ha un codice univoco composto da 13 caratteri (lettere e numeri).
Il peso è stato misurato con un sistema PLF basato sul principio del "*walk-over-weight*", vale a dire attraverso l'utilizzo di sensori a pressione, in grado di rilevare il peso durante la deambulazione degli animali. Più nello specifico, il sistema PLF era costituito dai seguenti componenti:

1. "*Stazione di rilevamento dati*" (SRD)

Questo componente è stato collocato nel punto di passaggio obbligato dei suini. Due paratie metalliche direzionavano il movimento in fila degli animali. La parte elettronica è stata posizionata in basso, in un apposito telaio, creando una superficie unica di pavimento. Il telaio conteneva i seguenti sensori: 4 piastre elettroniche a pressione, un sensore di temperatura e umidità, un'antenna HF in grado di leggere i TAE a distanza di 50-60 cm in altezza. Ulteriori componenti elettronici di supporto uniti ai sensori erano unità di raccolta dati, energia di supporto e comunicazione dati.
La stazione di rilevamento dati è stata collegata all'unita di gestione dati e comunicazione con cavo USB.

2. "*Unità di gestione dati e comunicazione*" (UGDC)

Questa unità immagazzina i dati rilevati dalla SRD e li invia al *server* esterno, con un protocollo di comunicazione misto GSM e LoRa. I vari componenti erano posizionati dentro un involucro appositamente stampato in 3D e che conteneva: unità di immagazzinamento dati, unità di tramissione LoRa per lunghe distanze, unità di trasmissione GSM, unità di conversione di alimentazione elettrica. L'UGDC era collegata alla rete elettrica della porcilaia e forniva energia anche alla SRD.

3. "*Server e software*"

I dati ricevuti dalla UGDC venivano depositati in un *server* esterno (Cloud), con una frequenza che dipendeva dalla capacità della linea GSM disponibile durante la giornata. Una volta sul *server*, i dati venivano accumulati e inviati all'utente finale due volte al giorno (ore 9:00 e

21:00), al fine di ridurre il carico sulle linee di trasmissione. Il *server* era dotato di una serie di "filtri", impostati manualmente, in grado di escludere letture false/parziali e di inviare allarmi in caso di valori ambientali anomali o protratta assenza di dati rilevati.
Infine, i seguenti dati venivano presentati su una piattaforma *web* (WebApp) con una pagina di gestione e presentazione dati (UI-UX):

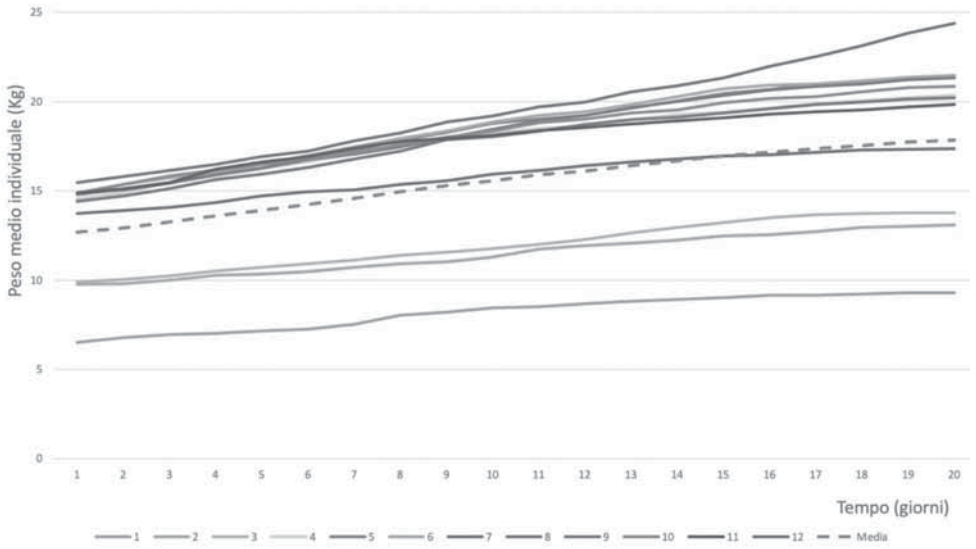
a) temperatura e umidità ambientali (valori massimi, minimi e andamento giornaliero);
b) peso di ogni singolo suino, espresso come media di almeno due misurazioni giornaliere;
c) media del peso dell'intero gruppo, valori massimi e minimi;
d) numero di passaggi giornalieri attraverso la SRD (dati individuali, media del gruppo, valori massimi e minimi).

Come controllo, il peso di ciascun suino è stato misurato anche "manualmente" per due volte, a distanza di dieci giorni l'una dall'altra. I dati raccolti sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva con *software* STATA.

RISULTATI

Temperatura e umidità sono rimaste piuttosto costanti durante l'intero periodo di osservazione. Le escursioni termiche giornaliere sono state di circa 4°C (10°C<t<14°C), mentre l'umidità è rimasta sempre compresa fra il 32% e il 47%.
Il sistema è stato in grado di tracciare individualmente i suini "taggati" e di rilevarne il peso. A tal proposito, i dati vengono sinteticamente riassunti nel Grafico n°1 e in Tabella n°1. La correlazione fra peso rilevato dalla SRD e manualmente è stata sempre molto forte (coefficiente di *Pearson* >0.92). Il numero medio di "letture SRD"/suino/*die* (vale a dire "numero di passaggi giornalieri attraverso la SRD") è stato pari a 5.4.

Grafico n°1. Ciascuna linea corrisponde ad un suino, identificato con TAE. La linea tratteggiata rappresenta la media del gruppo. Il grafico evidenzia la notevole disomogeneità del gruppo e la tendenza positiva di accrescimento, seppur con evidenti differenze fra un soggetto e l'altro.
Graphic n.1. *Each line corresponds to a pig, identified by means of an electronic tag. The dashed line represents the average weight of the group. The graphic highlights the considerable heterogeneity of the group and the growth trend, albeit with obvious differences between one pig and another.*



	Peso rilevato “manualmente” (Kg)	Peso rilevato dalla SRD (Kg)
T10		
Suino più leggero	6.54	6.52
Suino più pesante	15.45	15.46
Media del gruppo	12.68	12.7
T20		
Suino più leggero	9.32	9.31
Suino più pesante	24.31	24.3
Media del gruppo	17.84	17.85

Tabella n°1. A titolo di esempio, si riportano alcuni dati (valori minimi, massimi e medi) rilevati al decimo (T10) e ventesimo (T20) giorno di osservazione. Come si può vedere, il peso rilevato dalla SRD è di fatto sovrapponibile con quello misurato con una bilancia “convenzionale”.
Table n.1. As example, data (minimum, maximum and average values) collected on 10th (T10) and 20th (T20) day of observation are shown. Body weights detected by electronic sensors are almost identical to those measured by the operator by means of a digital scale.

DISCUSSIONE

Il progresso tecnologico sta fornendo una serie di strumenti utili per una gestione “precisa” delle produzioni animali, a livello individuale e collettivo. Ciò risponde a specifiche esigenze zootecniche, sanitarie, etiche e di puro *marketing*, sulla spinta della crescente sensibilità del consumatore nei confronti delle problematiche connesse all’allevamento intensivo del bestiame (Wognum et al., 2011). Il nostro studio si colloca pienamente in questo ambito, nel solco di varie iniziative internazionali per il miglioramento della tracciabilità delle filiere alimentari (Yuan et al., 2018).
Nel complesso, la tecnologia sviluppata si è dimostrata in grado di tracciare individualmente i suini marcati con TAE, fornendo dati estremamente precisi e in tempo reale circa il loro accrescimento ponderale. Tuttavia, lo studio ha dovuto affrontare una serie di difficoltà, di seguito sinteticamente elencate:

a) La SRD è stata percepita dai suini come una sorta di arricchimento ambientale, stimolando attività di masticazione, grufolamento e tentativi di passaggio attraverso le paratie laterali. Ciò ha portato al fallimento di alcuni test preliminari ed ha reso necessario l’utilizzo di una struttura molto più solida rispetto alle attese.
b) Il passaggio dei suini attraverso la SRD avviene in modo discontinuo, con dei picchi giornalieri. Ciò ha determinato una sorta di “collo di bottiglia” nel flusso dei dati ed ha reso indispensabile l’uso di una unità GSM più potente e di un amplificatore di segnale.
c) Inizialmente sono stati rilevati molti dati “anomali”, dovuti all’appoggio parziale dei suini sulle piastre elettroniche a pressione. Per risolvere il problema, sono stati imposti dei “filtri” di selezione dei dati, nel passaggio fra il server esterno (Cloud) e la piattaforma di utilizzo (WebApp). I filtri hanno dimezzato il volume totale di dati inviati rendendoli, però, molto più attendibili e fortemente correlati con le misurazioni manuali.

CONCLUSIONI

L’esperienza maturata indica che la tracciabilità dei suini e l’acquisizione digitale di dati utili è possibile, a costi già piuttosto contenuti (lo sviluppo del prototipo è costato meno di 2000 euro), anche laddove sia richiesto il superamento di barriere infrastrutturali e tecnologiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Berckmans D. (2015) “Experiences with Precision Livestock Farming in European Farms” in: “International Symposium on Animal Environment and Welfare, Oct. 23–26, 2015, Chongqing, China” Beijing, China Agriculture Press, 303-308.
2. Canali G. (2014) “Il mercato della carne suina. Rapporto 2012”. Centro Ricerche Economiche Filiere Sostenibili.
3. Gómez Y., Stygar A.H., Boumans I.J., Bokkers E.A., Pedersen L.J., Niemi, J.K., Llonch P. (2021) “A systematic review on validated Precision Livestock Farming technologies for pig production and its potential to assess animal welfare”. Front Vet Sci. 8, 565-660.
4. Hemsworthlt P.H., Barnett J.L., Coleman G.J. (1993) “The human-animal relationship in agriculture and its consequences for the animal”. Anim Welf. 2, 33-51.
5. ISTAT (2020): https://www.istat.it/it/files/2021/05/Report-tecnologie-aziende-zootecniche_2020.pdf
6. Madec F., Geers R., Vesseur P., Kjeldsen, N., Blaha, T. (2001) “Traceability in the pig production chain”. Rev Sci Tech. 20, 523-537.
7. Norton T., Chen C., Larsen M.L.V., Berckmans D. (2019) “Precision livestock farming: Building ‘digital representations’ to bring the animals closer to the farmer”. Animal 13, 3009-3017.
8. Spiessl-Mayr E., Wendl G., Zähner M., Klindtworth K., Klindtworth M. (2005) “Electronic identification (RFID technology) for improvement of traceability of pigs and meat” in: Cox S. “Precision Livestock Farming ‘05”, Wageningen Academic Publishers, 339-345.
9. Wognum P.N., Bremmers H., Trienekens J.H., Van Der Vorst J.G., Bloemhof, J.M. (2011) “Systems for sustainability and transparency of food supply chains–Current status and challenges”. Adv Eng Inform. 25, 65-76.
10. Yuan Y., Liu X., Hong K., Song S., Gao W. (2018) “Trustworthy traceability of quality and safety for pig supply chain based on blockchain”. In: ISAIR “3rd International Symposium on Artificial Intelligence and Robotics, Nanjing, China, 24-25 November 2018”, Springer, Cham, 343-355.

ANDAMENTO TEMPORALE DEL CONSUMO DI ANTIMICROBICI IN SVEZZAMENTI DEL NORD ITALIA NEL 2016-2019

TEMPORAL VARIATION IN ANTIMICROBIAL USAGE IN NORTH ITALIAN WEANER FARMS FROM 2016 TO 2019

ROMEO C., SCALI F., SANTUCCI G., MAISANO A., GUADAGNO F., FORMENTI N., TONNI M., ALBORALI G.L.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Parole chiave: sito 2, consumo di antimicrobici, antimicrobici critici
Keywords: weaned pigs, AMU, critically important antimicrobials

RIASSUNTO

Lo svezzamento è generalmente la fase della produzione suinicola in cui il consumo di antimicrobici è maggiore, essendo tra i momenti più a rischio per l'insorgenza di infezioni. Scopo del lavoro è quello di indagare l'andamento temporale dei consumi in suini svezzati, con particolare attenzione ai farmaci critici. Lo studio ha coinvolto 84 partite prodotte tra il 2016 ed il 2019 in 5 allevamenti del Nord Italia. Il consumo di antimicrobici è stato stimato in base ai dati forniti dagli allevatori, secondo lo standard *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit), considerando come critici i principi appartenenti alla categoria B EMA. In media, il consumo totale è risultato elevato (201 DDD/capo; 95%IC: 186–216), ma con una significativa diminuzione nel corso degli anni esaminati. In particolare, l'impiego di molecole critiche ha subito una riduzione estremamente marcata fino quasi ad azzerarsi nel 2019, risultato da imputarsi principalmente all'abbandono dell'uso della colistina. A livello stagionale, si osservano consumi più cospicui nelle partite il cui ciclo inizia in primavera-estate, *pattern* che dovrà essere meglio indagato in futuro con l'ausilio di dati epidemiologici. In generale, nonostante si confermi l'elevato utilizzo di antimicrobici in svezzamento, un dato incoraggiante è rappresentato dalla progressiva riduzione dei consumi, *trend* che dovrà essere confermato per il futuro ed ulteriormente indagato aumentando il numero di partite e allevamenti esaminati.

ABSTRACT

Weaning typically represents the stage of swine production with the highest antimicrobial usage (AMU) due to the high infection risk in this production phase. The present study aimed at investigating annual and seasonal variation of AMU in weaned pigs, with a focus on critically important antimicrobials. The study includes data from 84 batches of weaned pigs produced from 2016 to 2019 in 5 North Italian farms. AMU was estimated from farm data, applying *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit). All the drugs included in in EMA's category B classes were considered as critical antimicrobials. On average, total AMU was still high (201 DDD/pig; 95%IC: 186–216), but a significant reduction in consumption from 2016 to 2019 was detected. Similarly, usage of critical classes markedly decreased during the years, becoming almost zero in 2019, likely because of the cessation of colistin use. Concerning seasonal variation in AMU, a

significantly higher usage was observed in those batches whose production started in spring-summer. The causes underlying this pattern should be further investigated based on epidemiological data. Overall, although the present study confirms the high use of antimicrobials in weaning, an encouraging result is represented by the gradual reduction in AMU observed over the years, a trend that needs to be maintained in the future and further investigated by increasing the number of examined batches and farms.

INTRODUZIONE

L'uso irrazionale degli antimicrobici in medicina umana e animale rappresenta un problema rilevante in relazione al fenomeno dell'antibiotico resistenza (AMR). L'insorgenza di AMR nei batteri è infatti un fenomeno naturale, facilitato tuttavia dall'esposizione prolungata a dosi sub-letali di principi antimicrobici (Woolhouse et al., 2015). Diventa quindi fondamentale limitare il rilascio in ambiente degli stessi attraverso un loro impiego contenuto e razionale, onde limitare l'insorgenza e la diffusione di ceppi batterici antibiotico-resistenti. In particolare, da un punto di vista di sanità pubblica risulta di fondamentale importanza la razionalizzazione del consumo di quei principi antimicrobici considerati critici per la medicina umana (EMA, 2019; WHO, 2019). L'insorgenza dell'AMR è peraltro un fenomeno in cui uomo, ambiente e animali da reddito sono strettamente interconnessi ed il cui contrasto richiede quindi l'adozione di politiche di riduzione dei consumi sia in ambito di medicina umana che animale.
Negli ultimi anni, a vari livelli, sono state promosse iniziative atte alla riduzione dell'uso degli antimicrobici sia totale che mirata su principi attivi di particolare importanza come la colistina (Ministero della Salute, 2017). Tali politiche hanno portato, tra il 2010 ed il 2020, ad una riduzione delle vendite di antimicrobici in Italia di quasi il 60% e, per quanto riguarda la colistina, di ben il 98% (EMA, 2021). Tuttavia, i dati di vendita non sono sufficienti a discernere l'andamento dei consumi a livello di specie, inoltre, all'interno della stessa specie l'esposizione a questi farmaci può variare sensibilmente in base alla categoria d'età. Per quanto riguarda la produzione suinicola, lo svezzamento rappresenta una delle fasi più a rischio per l'insorgenza d'infezioni e quella dove tendenzialmente si somministrano più antimicrobici (Bassi et al., 2021; Callens et al., 2012). Scopo di questo lavoro è quello di indagare l'andamento stagionale e annuale del consumo di antimicrobici in suini svezzati, con particolare attenzione al consumo degli antimicrobici critici.

MATERIALI E METODI

Lo studio ha coinvolto 84 partite di suini svezzati prodotte tra il 2016 ed il 2019 in cinque diversi allevamenti del Nord Italia, per un totale di 204.990 suini in entrata e 180.933 suini venduti. Il campione risultava equamente distribuito tra allevamenti (*range*: 16 – 17 bande/allevamento), stagioni (18 – 21 bande/stagione) e anni (20 – 23 bande/anno). I dati grezzi relativi al consumo di antimicrobici sono stati forniti direttamente dagli allevatori. Per ognuna delle partite, il consumo totale di antimicrobici è stato stimato in base allo standard *Defined Daily Dose Animal for Italy* (DDDAit) come DDD/capo. 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 = suini della partita in entrata
- Peso standard = 12 Kg

Per quanto riguarda le molecole "critiche", si è proceduto con la medesima formula considerando come critici i principi appartenenti alle classi della categoria B EMA. Nella fattispecie: cefalosporine di III e IV generazione, chinoloni (tutti), polimixine e chinoloni (EMA, 2019).
La variazione nel consumo medio di antimicrobici per partita nel tempo è stata analizzata mediante modello lineare misto con distribuzione normale dell'errore. Sono state considerate come variabili predittive stagione e anno di inizio del ciclo produttivo ed una variabile binaria denominata "Cambio stagione", ad indicare se il ciclo si fosse svolto a cavallo di due diverse stagioni o meno. La variabile allevamento è stata inclusa nel modello come intercetta *random*. Per i fattori con più di due livelli, i confronti a posteriori sono stati effettuati mediante t-test sulle differenze dei minimi quadrati, applicando la correzione di Tukey per confronti multipli. La normalità dei residui è stata verificata mediante test di Shapiro-Wilk (W=0,99; p=0,5). Gli andamenti stagionali ed annuali del consumo di antimicrobici critici sono invece stati analizzati attraverso test non-parametrici di Kruskal Wallis. I risultati sono considerati significativi in caso di p-value (p) inferiore a 0,05. Le analisi sono state effettuate mediante il software SAS/STAT 9.4 (Copyright © 2011, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RISULTATI

I dati produttivi medi del campione di 84 partite di svezzati utilizzati per lo studio sono riportati in Tabella 1. Il consumo medio di antimicrobici su tutto il campione è risultato essere pari a 201 DDD/capo (intervallo di confidenza al 95%: 186 – 216), con un minimo di 70 ed un massimo di 346 DDD/capo per partita. La distribuzione dei valori totali di consumo per partita è mostrata in Figura 1 e la distribuzione dei consumi per classe di antimicrobici in Tabella 2.

Tabella 1. Parametri produttivi del campione di suini svezzati (n=84 partite) utilizzato per lo studio del consumo di antimicrobici.
Table 1. Performance data of weaned pig (n=84 batches) used in the present study for the analysis of antimicrobial usage.

Parametro	Media ± Errore Standard
Entrati (n)	2440 ± **82**
Venduti (n)	2154 ± 73
Età in entrata (gg)	25,2 ± 0,4
Età in uscita (gg)	89,6 ± 1,1
Peso in entrata (Kg)	6,3 ± 0,1
Peso in uscita (Kg)	34,1 ± 0,9
Mortalità (%)	6,2 ± 0,4

Figura 1. Distribuzione di frequenza dei valori di consumo di antimicrobici nel campione di partite di suini svezzati (n=84) provenienti da cinque allevamenti del Nord Italia.
Figure 1. Frequency distribution of antimicrobial usage values in the examined sample of weaned pig batches (n=84) from five North Italian farms.

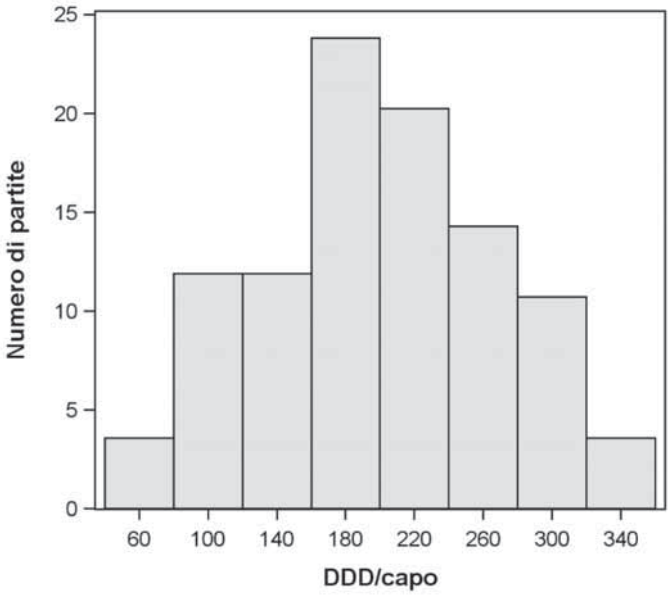


Tabella 2. Distribuzione delle somministrazioni di antimicrobici per classe, consumo totale e andamento pluriennale, le classi critiche (categoria B EMA) sono evidenziate in grassetto
Table 2. Distribution of antimicrobial administrations by class, total consumption, and multi-year trend. Critical classes (EMA's category B) are highlighted in bold.

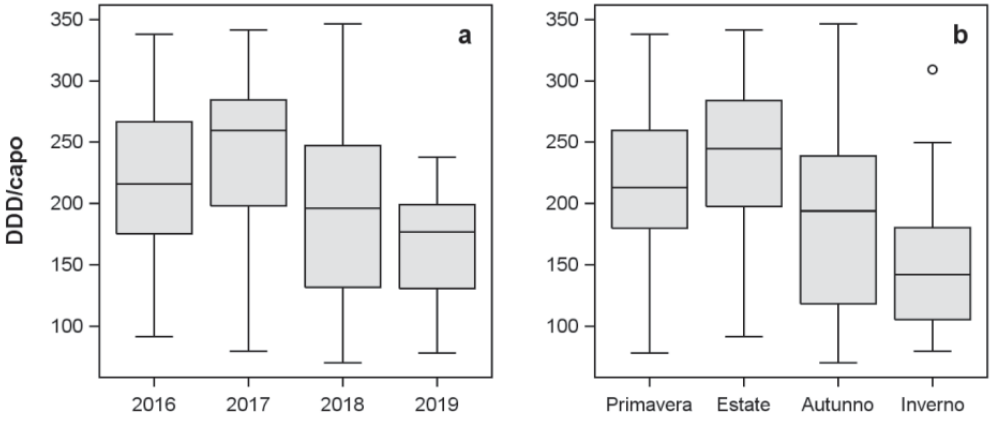
Classe	**Totale (%)**	**2016 (%)**	**2017 (%)**	**2018 (%)**	**2019 (%)**
Aminopenicilline	63,0	56,3	63,1	66,5	64,5
Tetracicline	12,7	13,0	12,1	12,7	13,3
Pleuromutiline	7,9	4,7	8,2	8,1	10,2
Amminoglicosidi	7,4	9,4	8,1	6,3	5,9
Lincosamidi	3,9	1,9	5,7	2,8	4,7
Polimixine	**2,6**	**11,4**	**0,9**	**0**	**0**
Sulfamidici	1,4	2,5	0,4	2,0	1,0
Macrolidi	0,7	0,4	0,6	1,5	0,2
Amfenicoli	0,3	0,3	0,6	0,2	0,2
Cefalosporine (III-IV Gen.)	**0,1**	**0,01**	**0,2**	**0**	**0**
Chinoloni	**0,1**	**0,04**	**0,1**	**0,1**	**0,02**

Per quanto riguarda il consumo totale di antimicrobici, questo è risultato variare significativamente sia negli anni che nelle diverse stagioni (p=0,0014 e p=0,0001), mentre il fatto che un ciclo produttivo si svolgesse a cavallo di due diverse stagioni non è risultato avere alcuna relazione con il consumo di farmaco (Tabella 3). Nel dettaglio, si osserva una generale riduzione del consumo negli anni, con un valore medio di DDD/capo nel 2019 significativamente inferiore a tutti gli anni precedenti (p_{adj}<0,05 per tutti i confronti; Figura 2a). Per quanto riguarda invece l'andamento stagionale, si osservano consumi significativamente maggiori in primavera ed estate rispetto all'inverno (p_{adj}=0,01 e p_{adj}<0,0001, rispettivamente), che risulta invece essere la stagione con le DDD/capo più ridotte (Figura 2b).

Tabella 3. Modello lineare misto che descrive la variazione temporale nel consumo di antimicrobici (DDD/capo) in partite di suini svezzati (n=84) provenienti da cinque allevamenti del Nord Italia.
Table 3. Linear mixed model analysing temporal variation in antimicrobial usage (DDD/animal) in weaned pig batches (n=84) from five North Italian farms.

Variabile predittiva	Livelli	Stima del parametro (media ± ES)	Anova	p
Stagione	Primavera	56,5 ± 17,6	$F_{3, 72}$=7,75	**0,0001**
	Estate	81,4 ± 17,3		
	Autunno	36,3 ± 18,3		
Anno	2016	47,5 ± 18,3	$F_{3, 72}$=5,54	**0,0014**
	2017	69,3 ± 17,8		
	2018	22,6 ± 17,6		
Cambio stagione	Sì	5,54 ± 13,7	$F_{1, 72}$=0,16	0,69

Figura 2. Consumo annuale (a) e stagionale (b) di antimicrobici in partite di suini svezzati (n=84) provenienti da cinque allevamenti del Nord Italia.
Figure 2. Antimicrobial usage by year (a) and season (b) in weaned pig batches (n=84) from five North Italian farms.



Infine, per quanto riguarda il consumo di antimicrobici critici, anche in questo caso si osserva una riduzione altamente significativa delle DDD/capo nel corso degli anni (χ_3=33.6; p<0,0001), in particolare tra il 2016 e gli anni successivi (Tabella 3). Non si osservano al contrario differenze significative tra stagioni (p=0.08).

Tabella 3. Consumo annuale di antimicrobici critici (DDD/capo) in partite di suini svezzati (n=84) provenienti da cinque allevamenti del Nord Italia.
Table 3. Usage (DDD/head) of critical antimicrobial classes by year in weaned pig batches (n=84) from five North Italian farms.

Anno	Mediana	Range interquartile	Range (min – max)
2016	23,58	40,01	0 – 57,76
2017	0,11	0,30	0 – 19,20
2018	0,07	0,16	0 – 0,87
2019	0	0	0 – 0,24

DISCUSSIONE

Sebbene negli ultimi anni gli studi italiani sull'uso degli antimicrobici nell'allevamento suino siano aumentati (Bassi et al., 2021; Scali et al., 2020; Scoppetta et al., 2017; Tarakdjian et al., 2020), i dati sulla fase di svezzamento risultano ancora piuttosto limitati. In particolare, informazioni dettagliate sull'impiego di questi farmaci a livello di singola partita non erano ancora disponibili.

Nel complesso, il consumo totale di antimicrobici rilevato nello studio si è dimostrato elevato; ad esempio, pur con tutti i limiti legati all'utilizzo di differenti standard per la stima dei consumi, l'impiego medio di antimicrobici nelle partite investigate è risultato di circa venti volte superiore a quello riportato in Danimarca nel 2015 per la medesima categoria d'età (Bortolaia et al., 2019). I consumi sono risultati più elevati, circa il doppio, anche rispetto a quanto descritto da un recente studio svolto in Emilia Romagna (Bassi et al., 2021). Tuttavia, questo confronto deve essere effettuato con cautela poiché nel presente studio sono stati reclutati unicamente svezzamenti "puri" (siti2) mentre nel lavoro di Bassi e colleghi si trattava principalmente di svezzati allevati in altre tipologie produttive (Bassi et al., 2021). Per quanto riguarda l'andamento temporale dei consumi, è emersa una diminuzione significativa dell'impiego di antimicrobici nel corso degli anni, dato particolarmente incoraggiante considerando che negli allevamenti coinvolti non erano state implementate pratiche di *stewardship* mirate. Tale risultato, unitamente a livelli di consumo comunque ancora elevati, suggerisce che restino ampi margini di miglioramento per quanto concerne la riduzione dell'uso di antimicrobici. Un esempio è rappresentato dal miglioramento del *management* e della biosicurezza, che dovrebbe rendere possibile la riduzione dei consumi senza danneggiare la produzione (Postma et al., 2017). A causa di limiti quantitativi e qualitativi delle fonti, non è stato possibile identificare con certezza il target dei trattamenti che, pertanto, dovranno essere investigati in lavori futuri. In particolare, il frequente ricorso alle aminopenicilline (oltre il 60% dei consumi) potrebbe essere almeno parzialmente imputabile ad infezioni da *Streptococcus suis*. In questi casi, il ricorso all'uso di antimicrobici può essere ridotto adottando un approccio più ampio che comprenda dei buoni livelli di biosicurezza, un adeguato management aziendale, una corretta strategia vaccinale e l'impiego di specifici additivi alimentari (Correa-Fiz et al., 2020; Segura et al., 2020).

Per quanto riguarda la classificazione degli antimicrobici critici, si è scelto di considerare critiche le classi incluse nella categoria B EMA. Tale classificazione differisce da quella dell'OMS solo per quanto riguarda i macrolidi, considerati dall'OMS come critici anche per il loro ruolo fondamentale nel trattamento delle infezioni da *Campylobacter* spp. (WHO, 2019). Tuttavia, il suino è considerato una fonte minore di queste infezioni, soprattutto rispetto agli avicoli (Alban et al., 2008; Heredia and García, 2018). Nelle partite incluse nello studio, l'impiego dei macrolidi è risultato comunque poco diffuso, rappresentando meno dell'1% dei consumi totali. L'utilizzo di principi attivi critici ha subito una riduzione marcata nel corso dei tre anni presi in esame, fino quasi ad azzerarsi nel 2019. Nel 2016, l'impiego di questi antimicrobici era elevato, con una mediana di circa 24 DDD/capo e picchi vicino alle 60 DDD/capo. Già a partire dall'anno successivo, tale impiego si è però ridotto notevolmente con consumi elevati solo in un numero limitato di partite. Nel 2018 non si sono registrati picchi di utilizzo in nessuna partita ed infine, nel 2019, la quasi totalità delle partite non è stata trattata con alcun farmaco critico. Tale risultato è da imputarsi principalmente all'abbandono dell'uso della colistina che, inizialmente, rappresentava oltre l'11% degli interi consumi. Il nostro paese è passato infatti, nell'arco di dieci anni, dall'essere uno dei maggiori consumatori di colistina in Europa ad uno dei minori (EMA, 2021).
Per quanto concerne invece i *trend* di consumo stagionali, si osserva un impiego complessivo di antimicrobici più cospicuo nelle partite il cui ciclo produttivo inizia durante la primavera-estate, rispetto alle partite che entrano in svezzamento durante l'inverno. Una possibile spiegazione per questo dato potrebbero essere le temperature più elevate che favoriscono la diffusione di ceppi di *Escherichia coli* enterotossigeni (Philipsborn et al., 2016), frequente causa di diarrea durante le prime settimane post-svezzamento (Fairbrother and Nadeau, 2019). Tuttavia, in assenza di dati epidemiologici, non è attualmente possibile dare una spiegazione certa al *pattern* osservato. Contrariamente a quanto atteso, non è stato inoltre rilevato alcun incremento di consumi nelle partite il cui ciclo si svolge a cavallo di due diverse stagioni, ma anche in questo caso sarebbe necessaria un'analisi più approfondita corredata di dati climatici per verificare se siano avvenuti realmente degli sbalzi repentini di temperatura durante tali cambi oppure, anche in virtù del cambiamento climatico, questi sbalzi si siano verificati lontani dal cambio di stagione.
Sebbene siano stati analizzati i dati di 84 partite che coinvolgevano oltre 200.000 suini, i risultati di questo studio devono essere interpretati con cautela, sia per i limiti del campione che era costituito da sole cinque aziende, sia per i potenziali problemi di qualità di alcune delle fonti dati.

CONCLUSIONI

Lo studio evidenzia un consumo elevato di antimicrobici nei suini durante il periodo dello svezzamento, dato che risulta in linea con quanto atteso per questa categoria di animali. Sebbene anche durante il 2019 l'impiego di tali farmaci sia rimasto frequente, la significativa riduzione che si è registrata nel corso degli anni rappresenta un dato incoraggiante ed un *trend* che dovrà essere mantenuto in futuro. Se confermato su un campione più ampio, l'effetto della stagione sull'andamento dei consumi dovrà essere un parametro da prendere in considerazione anche nella gestione aziendale. Tuttavia, il potenziale effetto degli sbalzi di temperatura dovrà essere investigato più accuratamente, tenendo conto di dati climatici precisi. L'utilizzo di antimicrobici critici, in particolare della colistina, che era notevolmente elevato all'inizio dello studio (2016), si è progressivamente ridotto, fino quasi ad azzerarsi nel 2019. Tale risultato conferma come sia possibile allevare suini senza la somministrazione di tali molecole, anche in contesti industriali.

BIBLIOGRAFIA

1. Alban L., Nielsen E.O., Dahl J. (2008) "A human health risk assessment for macrolide-resistant *Campylobacter* associated with the use of macrolides in Danish pig production". Prev. Vet. Med. 83, 115–129.
2. Bassi P., Trevisi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Rugna G., Motta V., Diegoli G., Merialdi, G. (2021) "Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia Romagna nel triennio 2016- 2018". Atti della SIPAS, Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini: XLVI Meeting Annuale. Peschiera (VR), 9-10 Settembre 2021, 243–249.
3. Bortolaia V., Hendriksen R.S., Borck Høg B., Ellis-Iversen J., Korsgaard H.B., Petersen C.K., Boel J., Dalby T., Hammerum A.M., Hansen F., et al. (2019) "DANMAP 2018: Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark". (Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark).
4. Callens B., Persoons D., Maes D., Laanen M., Postma M., Boyen F., Haesebrouck F., Butaye P., Catry B., Dewulf, J. (2012) "Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds". Prev. Vet. Med. 106, 53–62.
5. Correa-Fiz F., Neila-Ibáñez C., López-Soria S., Napp S., Martinez B., Sobrevia L., Tibble S., Aragon V., Migura-Garcia, L. (2020) "Feed additives for the control of post-weaning Streptococcus suis disease and the effect on the faecal and nasal microbiota". Sci. Rep. 10, 20354.
6. EMA (2019) "Categorisation of antibiotics in the European Union". Disponibile a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/categorisation-antibiotics-european-union-answer-request-european-commission-updating-scientific_en.pdf
7. EMA (2021) "Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020". Disponibile a: https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf
8. Fairbrother J.M., Nadeau É. (2019) "Colibacillosis". In: Zimmerman J.J, Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson J.W., Zhang J. "Diseases of Swine", 11a ed., John Wiley & Sons, Ltd, 807–834.
9. Heredia N., García S. (2018) "Animals as sources of food-borne pathogens: A review". Anim. Nutr. 4, 250–255.
10. Ministero della Salute (2017) "Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020". Disponibile a: https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=2660
11. Philipsborn R., Ahmed S.M., Brosi B.J., Levy K. (2016) "Climatic Drivers of Diarrheagenic *Escherichia coli* Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis". J. Infect. Dis. 214, 6–15.
12. Postma M., Vanderhaeghen W., Sarrazin S., Maes D., Dewulf J. (2017) "Reducing Antimicrobial Usage in Pig Production without Jeopardizing Production Parameters". Zoonoses Public Health 64, 63–74.
13. Scali F., Santucci G., Maisano A.M., Giudici F., Guadagno F., Tonni M., Amicabile A., Formenti N., Giacomini E., Lazzaro M., et al. (2020) "The Use of Antimicrobials in Italian Heavy Pig Fattening Farms". Antibiotics 9, 892.
14. Scoppetta F., Sensi M., Franciosini M.P., Capuccella M. (2017) "Evaluation of antibiotic usage in swine reproduction farms in Umbria region based on the quantitative analysis of antimicrobial consumption". Ital. J. Food Saf. 6, 6886.
15. Segura M., Aragon V., Brockmeier S.L., Gebhart C., de Greeff A., Kerdsin, A., O'Dea,

M.A., Okura M., Saléry M., Schultsz C., et al. (2020). "Update on Streptococcus suis Research and Prevention in the Era of Antimicrobial Restriction: 4th International Workshop on *S. suis*". Pathogens 9, 374.
16. Tarakdjian J., Capello K., Pasqualin D., Santini A., Cunial G., Scollo A., Mannelli A., Tomao P., Vonesch N., Di Martino G. (2020). "Antimicrobial use on Italian Pig Farms and its Relationship with Husbandry Practices". Animals 10, 417.
17. Woolhouse M., Ward M., van Bunnik B., Farrar J. (2015) "Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment". Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 370, 20140083.
18. WHO (2019) "Critically important antimicrobials for human medicine". Disponibile a: https://apps.who.int/iris/handle/10665/312266

UNA MISCELA MICROINCAPSULATA DI SOSTANZE AROMATIZZANTI IN SUINETTI INFETTATI ARTIFICIALMENTE CON *ESCHERICHIA COLI* F4 ALLO SVEZZAMENTO

A MICROENCAPSULATED MIXTURE OF BOTANICALS IN PIGLETS ARTIFICIALLY INFECTED WITH ESCHERICHIA COLI F4 AT WEANING

TUGNOLI B.[1], BONETTI A.[2], PIVA A.[1,2], GRILLI E.[2,3]

[1] *Vetagro S.p.A., via Porro 2, 42124, Reggio Emilia, Italia;*
[2] *DIMEVET, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra, 50, 40064, Ozzano dell'Emilia (BO), Italia;*
[3] *Vetagro Inc., 17 E. Monroe St., Suite #179, 60603, Chicago, IL, USA*

Parole chiave: *Escherichia coli* K88, sostanze aromatizzanti, microincapsulazione
Keywords: *Escherichia coli* K88, botanicals, microencapsulation

RIASSUNTO
Lo studio ha valutato l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti in suinetti infettati artificialmente con *Escherichia coli* F4, principale agente responsabile della diarrea post-svezzamento. Un totale di 32 suinetti svezzati a 28 giorni sono stati divisi in 4 gruppi: controllo negativo, dieta standard, non infettato; controllo infettato (INF), dieta standard, infettato; gruppo ZnO (ZnO), dieta standard + ZnO a 2500 ppm, infettato; gruppo trattato (TRT), dieta standard + miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato. Dopo 18 giorni, è stato eseguito il challenge orale con *E. coli* F4 (ceppo di campo, resistente a colistina e rifampicina) e lo studio è proseguito per altri 14 giorni. Tutti gli animali infettati hanno mostrato segni clinici indotti dal challenge. Al giorno 3 post-challenge, il gruppo INF ha perso peso corporeo in modo significativo rispetto al controllo, mentre sia il gruppo ZnO che il gruppo TRT hanno mostrato valori intermedi di accrescimento ponderale ($P<0.01$). Il gruppo TRT ha ridotto parzialmente la conta dei batteri *E. coli* totali dopo il challenge (giorno 2 e 3) rispetto al controllo INF e ha ridotto la percentuale di positività ad *E. coli* F4 (inoculato) nei campioni fecali all'83.3% rispetto al 90.2% del gruppo INF e all'86% del gruppo ZnO. In conclusione, la miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti usata in questo studio può parzialmente aiutare i suinetti durante un challenge con *E. coli* F4.

ABSTRACT
The study evaluated the effect of a microencapsulated blend of botanicals, fed to weaning piglets artificially challenged with *Escherichia coli* F4, the main determining agent of post-weaning diarrhea. A total of 32 piglets weaned at 28 days of age were divided into 4 groups: negative control, basal diet, not challenged; infected control (INF), basal diet, challenged; ZnO group (ZnO), basal + 2500 ppm of ZnO, challenged; treated (TRT) group, basal diet + microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, challenged. After 18 days of study, the challenge consisted of an oral inoculation with *E. coli* F4 (field strain, colistin and rifampicin-resistant) and the study lasted 14 additional days. All the infected animals showed clinical signs induced by the challenge. At day 3 post-challenge, the INF group did lose weight significantly compared to control group, while both ZnO group and TRT group showed intermediate values of weight gain ($P<0.01$). The TRT group partially reduced the counts of total *E. coli* after the challenge (day 2 and 3) compared to INF group and reduced the percentage of positive fecal samples for *E. coli* F4 (inoculated) to 83.3% compared to 90.2% for INF group and 86% for ZnO group. In conclusion, the microencapsulated blend of botanicals used in this study can partially help piglets during a challenge with *E. coli* F4.

INTRODUZIONE

La diarrea post-svezzamento è una delle problematiche più critiche dell'industria suina mondiale, a causa del suo ingente impatto sui suinetti (Luppi, 2017). I principali agenti eziologici della diarrea post-svezzamento sono batteri *E. coli* enterotossigenici, in particolare *E. coli* F4/K88. Il batterio colonizza l'intestino tenue dove produce tossine che minano l'integrità della mucosa intestinale, causano infiammazione e stimolano l'insorgenza della diarrea (Dubreuil et al., 2016).

Storicamente i sintomi della diarrea post-svezzamento sono controllati con dosi farmacologiche (2000-3000 ppm) di ossido di zinco (ZnO), che riducono l'incidenza della diarrea e migliorano le performance di crescita dei suinetti allo svezzamento. L'utilizzo di queste dose medicinali di ZnO da giugno dell'anno corrente non sarà più consentito all'interno dell'Unione Europea, in virtù di problematiche di inquinamento ambientale e rischio di selezione di batteri antibiotico-resistenti (Bonetti et al., 2021). Le piante e i loro derivati fitogenici, quali oli essenziali e sostanze aromatizzanti, possono rappresentare un'alternativa promettente allo ZnO, grazie alle loro molteplici proprietà biologiche di tipo antimicrobico, anti-infiammatorio ed anti-ossidante (Rossi et al., 2020), azioni che, a livello intestinale, posso essere utili per il controllo di *E. coli* F4. I fitogenici introdotti oralmente con la dieta sono però soggetti ad un rapido assorbimento a livello gastrico che ne limita la disponibilità nell'intestino (Michiels et al., 2008). A questo proposito, la tecnologia della microincapsulazione è stata dimostrata essere uno strumento valido ed efficace per prevenire l'assorbimento e la degradazione gastrica di molecole bioattive, permettendone il rilascio lungo il tratto intestinale (Piva et al., 2007).

Scopo di questo studio è stato quello di valutare l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a confronto con ZnO farmacologico in suinetti infettati artificialmente con *E. coli* F4 allo svezzamento.

MATERIALI E METODI

Disegno sperimentale. In questo studio sono stati utilizzati 32 suinetti Large White ottenuti da scrofe SPF (specific-pathogen-free) e verificati essere suscettibili geneticamente ad *E. coli* F4 mediante verifica dei geni MUC4 e MUC13 in PCR (Rasschaert et al., 2007, Ren et al., 2012). I suinetti sono stati svezzati a 28 giorni (peso medio 6.75 ± 1.25 kg), sono stati allocati in box (4 animali/box) e assegnati a 4 gruppi sperimentali (8 animali/gruppo):

1) Gruppo controllo negativo (CTR), alimentato con una dieta standard, non sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
2) Gruppo controllo infettato (INF), alimentato con una dieta standard, sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
3) Gruppo ossido di zinco (ZnO), alimentato con una dieta standard addizionata con 2500 ppm di ZnO, sottoposto a challenge con *E. coli* F4;
4) Gruppo trattato (TRT) alimentato con una dieta standard supplementata con una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, sottoposto a challenge con *E. coli* F4.

Le diete consistevano in mangimi commerciali, non medicati, formulati sulla base delle indicazioni NRC (2012) e sono state fornite *ad libitum*, come farina, per tutta la prova.

Dopo 18 giorni di studio, il challenge è consistito nella somministrazione orale di un inoculo di *E. coli* F4 (ceppo di campo, resistente a colistina e rifampicina), con una dose di 10.3 Log_{10} CFU per suinetto. Lo studio è proseguito per altri 14 giorni dopo l'infezione, durante i quali è stato monitorato lo stato di salute degli animali (segni clinici, temperatura rettale, mortalità). Le performance di crescita individuali sono state misurate settimanalmente e i campioni fecali raccolti con frequenza definita (giorno -3, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14 post-challenge) per la conta batterica di *E. coli* totali e dell'inoculo *E. coli* F4. I campioni sono stati diluiti serialmente in soluzione fisiologica sterile e seminati su piastre MacConkey agar per la conta dei batteri *E. coli* totali o su piastre MacConkey

agar + rifampicina (250 mg/L) per la determinazione dei livelli di *E. coli* F4 inoculato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore.

Analisi statistica. I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism® con analisi ANOVA e le differenze considerate significative con P<0.05.

RISULTATI

Segni clinici e mortalità. A seguito del challenge, tutti gli animali infettati hanno mostrato segni clinici quali malessere, dispnea, diarrea e alterazioni della temperatura. In particolare, dal giorno del challenge molti degli animali infettati hanno mostrato ipotermia o ipertermia, mentre le temperature del gruppo di controllo sono rimaste normali. Considerando anormali temperature < 38.7°C o > 40.2°C, la frequenza di temperature anormali è stata di 0/96 per il gruppo CTR, 8/90 per il gruppo INF, 10/96 per il gruppo ZnO e 8/84 per il gruppo TRT cioè tutti i gruppi infettati sono risultati diversi dal controllo non infettato, ma non si sono osservate differenze tra i gruppi infettati. La mortalità è stata di 2 soggetti nel gruppo TRT (giorno 2 post-challenge) e di 2 soggetti nel gruppo INF (animali soppressi a causa di segni clinici molto severi al giorno 5 post-challenge).

Performance di crescita. Nella Tabella 1 sono mostrate le performance di crescita nel periodo precedente al challenge con *E. coli* F4: nessuna differenza significativa tra i gruppi è stata osservata nei pesi individuali né nell'accrescimento ponderale prima del challenge. Come mostrato in Figura 1, il challenge ha avuto un rapido effetto negativo sulla crescita degli animali con il gruppo INF che ha perso peso nei primi 3 giorni post-challenge ed è risultato significativamente differente rispetto al controllo, mentre sia il gruppo ZnO che il gruppo TRT hanno mostrato valori intermedi di accrescimento ponderale (P<0.01). Nelle due settimane successive al challenge non si sono osservate differenze significative su pesi e accrescimenti degli animali, ma il gruppo TRT ha migliorato numericamente l'accrescimento ponderale del periodo 0-7 giorni post-challenge, rispetto al gruppo INF e al gruppo ZnO (P=0.13). Complessivamente, per tutta la durata dello studio (dal giorno -18 al giorno 14), non ci sono state differenze significative sulle performance di crescita.

	Controllo negativo (CTR)	Controllo infettato (INF)	Gruppo ZnO (ZnO)	Gruppo trattato (TRT)	P
Peso (kg)					
Giorno -18	6.66	6.76	6.75	6.84	0.99
Giorno -14	8.33	8.66	8.25	8.49	0.94
Giorno -7	10.81	11.33	11.21	11.01	0.95
Giorno 0	14.48	15.29	15.28	15.65	0.78
Accrescimento ponderale (kg)					
Giorno -18 – 0	7.81	8.53	8.53	8.81	0.33

Tabella 1 – PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI PRIMA DEL CHALLENGE CON *E. COLI* F4.
I dati sono presentati come medie (n = 8). CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

Table 1 – GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS BEFORE *E. COLI* F4 CHALLENGE.
Data are presented as means (n = 8). CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

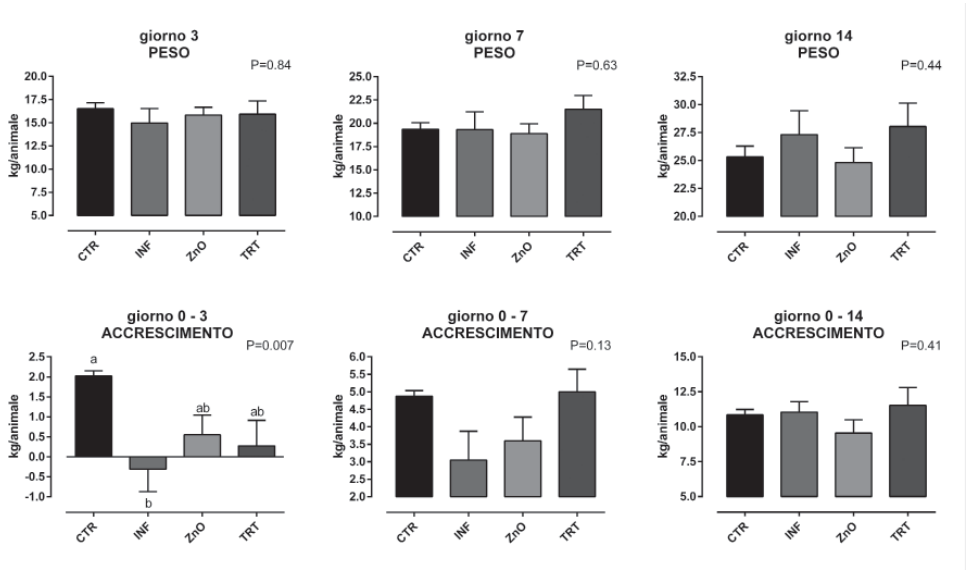


Figura 1 – **PERFORMANCE DI CRESCITA DEI SUINETTI DOPO IL CHALLENGE CON *E. COLI* F4**.
I dati sono presentati come medie (n = 8) e SEM rappresentate dalle barre verticali. [ab] Lettere differenti indicano differenze significative (P<0.05). CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

Figure 1 – **GROWTH PERFORMANCE OF PIGLETS AFTER *E. COLI* F4 CHALLENGE**.
Data are presented as means (n = 8) and SEM represented by vertical bars. [ab] Unlike letters indicate significant differences (P<0.05). CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

Conte di E. coli. In Figura 2 sono presentati i risultati delle conte fecali dei batteri *E. coli* totali e del ceppo *E. coli* F4 inoculato durante il challenge. Subito dopo il challenge, i livelli di *E. coli* totali sono aumentati significativamente in tutti i gruppi infettati rispetto al gruppo CTR (giorno 1). Nei giorni successivi (giorno 2 e 3) il gruppo TRT ha parzialmente ridotto i titoli di *E. coli* totali mostrando valori intermedi tra il controllo non infettato ed il controllo infettato INF. A fine prova (giorno 14) il gruppo ZnO ha mostrato conte di *E. coli* totali più bassi rispetto al gruppo TRT. Le conte del ceppo *E. coli* F4 inoculato sono risultate sempre simili tra i gruppi infettati ad eccezione del giorno 5 post-challenge in cui il gruppo ZnO ha ridotto significativamente i titoli di *E. coli* F4 rispetto al gruppo INF, mentre il gruppo TRT ha mostrato livelli intermedi (P<0.05). In Tabella 2 è presentata la prevalenza di *E. coli* F4 nei campioni fecali: tutti i campioni raccolti prima dell'inoculo o da soggetti non inoculati sono risultati negativi. Complessivamente dopo il challenge, la percentuale di positività a *E. coli* F4 nei campioni fecali è risultata del 90.2% per il gruppo INF ed è stata ridotta a 86% nel gruppo ZnO e a 83.3% nel gruppo TRT.

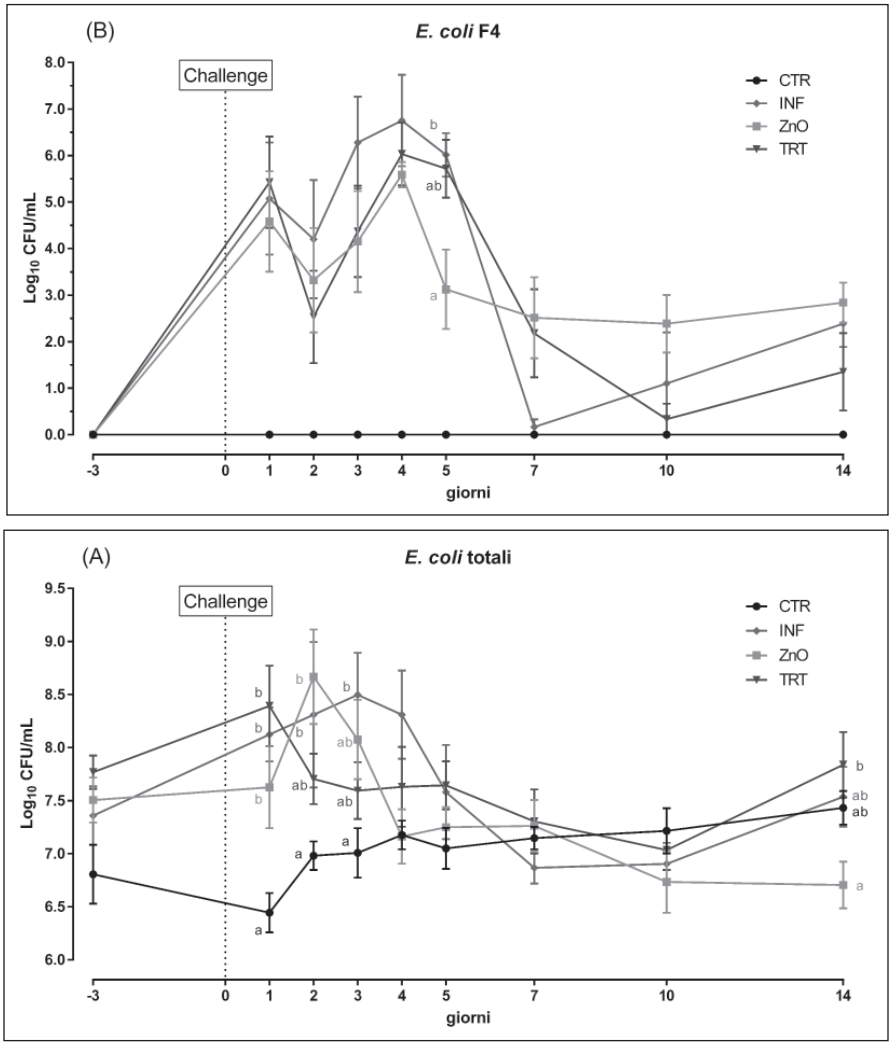


Figura 2 – CONTE DI *E. COLI* TOTALI (A) E DI *E. COLI* F4 (B) IN CAMPIONI FECALI (Log_{10} CFU/mL).
I dati sono presentati come medie (n = 8) e SEM rappresentate dalle barre verticali. [ab] Lettere differenti indicano differenze significative (P<0.05). Per *E. coli* F4 il gruppo CTR, non infettato, è stato escluso dall'analisi statistica. CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

Figure 2 – COUNTS OF TOTAL *E. COLI* (A) AND *E. COLI* F4 (B) IN FECAL SAMPLES (Log_{10} CFU/mL).
Data are presented as means (n = 8) and SEM represented by vertical bars. [ab] Unlike letters indicate significant differences (P<0.05). For *E. coli* F4 control group CTR, not infected, was excluded from the statistical analysis. CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

	giorno -3	giorno 1	giorno 2	giorno 3	giorno 4	giorno 5	giorno 7	giorno 10	giorno 14	Totale post-challenge
CTR	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/7	0/8	0/8	0/8	0/63 (0%)
INF	0/8	8/8	7/7	7/8	8/8	8/8	5/8	5/6	7/8	55/61 (90.2%)
ZnO	0/8	8/8	7/7	6/6	5/7	5/6	4/6	4/5	4/5	43/50 (86%)
TRT	0/7	8/8	8/8	8/8	8/8	6/6	1/6	1/4	5/6	45/54 (83.3%)

Tabella 2 – PREVALENZA DI *E. COLI* F4 IN CAMPIONI FECALI (NUMERO DI CAMPIONI POSITIVI / NUMERO DI CAMPIONI TOTALI).
CTR = gruppo controllo non infettato; INF = gruppo controllo infettato; ZnO = gruppo ZnO a 2500 ppm, infettato; TRT = gruppo trattato con miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a 2 kg/ton, infettato.

Table 2 – PREVALENCE OF *E. COLI* F4 IN FECAL SAMPLES (NUMBER OF POSITIVE SAMPLES / NUMBER OF TOTAL SAMPLES).
CTR = control group not infected; INF = control group infected; ZnO = group with ZnO at 2500 ppm, infected; TRT = group treated with a microencapsulated blend of botanicals at 2 kg/ton, infected.

DISCUSSIONE

In questo studio è stato utilizzato un modello di challenge con infezione da *E. coli* F4 in suinetti neo-svezzati, per valutare l'effetto di una miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti a confronto con ZnO farmacologico. Sono stati utilizzati suinetti, specific-pathogen free per *E. coli* F4, cioè privi di *E. coli* F4 dalla nascita, ma dotati nel genoma delle varianti dei geni delle mucine MUC4 e MUC13, considerati in letteratura i principali marker di suscettibilità genetica all'infezione da *E. coli* F4 (Rasschaert et al., 2007, Ren et al., 2012). L'infezione è stata indotta con un inoculo orale di *E. coli* F4 dopo 18 giorni di pre-trattamento alimentare con ZnO o con il prodotto incapsulato a base di sostanze aromatizzanti e gli animali sono stati monitorati per altri 14 giorni, in modo da considerare 4-5 settimane post-svezzamento, ossia il periodo più critico per il suinetto.
Il challenge ha causato in tutti gli animali infettati alterazioni cliniche quali malessere, diarrea, dispnea ed aumento della temperatura rettale, ossia segni clinici caratteristici dell'infezione da *E. coli* F4 (Luppi, 2017). Nessun particolare effetto protettivo sui segni clinici è stato osservato con i trattamenti alimentari di ZnO e del prodotto a base di sostanze aromatizzanti se non che lo ZnO ha evitato completamente la mortalità mentre 2 soggetti sono morti sia nel gruppo trattato sia nel gruppo controllo infettato.
Dal punto di vista delle performance di crescita, il challenge ha avuto un rapido impatto negativo andando, al giorno 3 post-infezione, a deprimere il peso degli animali infettati rispetto ai controlli non infettati, mentre sia lo ZnO farmacologico sia il prodotto incapsulato di sostanze aromatizzanti hanno migliorato l'accrescimento ponderale a parità di challenge. Un aumento numerico dell'accrescimento è stato osservato anche al giorno 7 nel gruppo trattato con il prodotto, ma non nel gruppo ZnO. Questo scarso effetto migliorativo sulle performance osservato con lo ZnO si discosta dalla nota e consolidata capacità dello ZnO farmacologico di supportare la crescita dei suinetti allo svezzamento, ma è probabilmente da ricondursi alla scarsa numerosità dei soggetti in prova e alla notevole variabilità tra gli animali.
Anche per quanto riguarda i rilievi microbiologici, l'infezione con *E. coli* F4 ha influito soprattutto durante i primi giorni post-challenge causando un aumento dei livelli sia dei batteri *E. coli* totali sia del ceppo *E. coli* F4 inoculato, con picco di eliminazione fecale al

giorno 3-4, in accordo con quanto riportato in letteratura (Luise et al., 2019). I trattamenti alimentari non hanno mostrato particolari effetti sulle conte batteriche, ad eccezione di una parziale riduzione dei titoli di *E. coli* totali nel gruppo con il prodotto incapsulato di sostanze aromatizzanti. Anche in questo caso la ragione è presumibilmente da attribuire alla variabilità e al numero scarso di campioni fecali raccolti durante la prova. La prevalenza di *E. coli* F4 nelle feci, cioè la percentuale di campioni positivi sul totale dei campioni fecali, ha però evidenziato - dal punto di vista numerico – una riduzione della positività di *E. coli* F4 sia con lo ZnO sia con il prodotto incapsulato, suggerendo comunque un parziale effetto positivo per entrambi i trattamenti nel controllo del ceppo *E. coli* F4 inoculato.

CONCLUSIONI

Pur con alcune limitazioni legate alla numerosità dei campioni e alla variabilità dei parametri analizzati, questo studio preliminare ha mostrato che questa miscela microincapsulata di sostanze aromatizzanti può avere un effetto parzialmente positivo in suinetti sottoposti a challenge con *E. coli* F4. Prove future sono necessarie per un'ulteriore validazione più approfondita.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonetti A., Tugnoli B., Piva A., Grilli E. (2021) "Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets". Animals, 11(3), 1-24.
2. Dubreuil J.D., Isaacson R.E., Schifferli D.M. (2016) "Animal Enterotoxigenic Escherichia coli". EcoSal Plus, 7(1), 1-47.
3. 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". J Anim Sci Biotechnol, 10, 53-72.
4. Luppi A. (2017) "Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance" Porcine Health Manag. 3(16), 1-18.
5. Michiels J., Missotten J., Dierick N., Fremaut D., Maene P., De Smet S. (2008) "In vitro degradation and in vivo passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets". J Sci Food Agric 88, 2371-2381.
6. National Research Council (NRC). (2012) "Nutrient requirement of pigs". 11a ed. National Research Council, Academy Press, Washington, DC, USA.
7. Piva A., Pizzamiglio V., Morlacchini M., Tedeschi M., Piva G. (2007) "Lipid microencapsulation allows slow release of organic acids and natural identical flavors along the swine intestine". J. Anim. Sci. 85, 486-493.
8. Rasschaert K., Verdonck F., Goddeeris B.M., Duchateau L., Cox E. (2007) "Screening of pigs resistant to F4 enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) infection". Vet Microbiol 123, 249-253.
9. Ren J., Yan X., Ai H., Zhang Z., Huang X., Ouyang J., Yang M., Yang H., Han P., Zeng W., Chen Y., Guo Y., Xiao S., Ding N., Huang L. (2012) "Susceptibility towards enterotoxigenic Escherichia coli F4ac diarrhea is governed by the MUC13 gene in pigs". PLoS One 7, e44573.
10. Rossi B., Toschi A., Piva A., Grilli E. (2020) "Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs". Nutr Res Rev. 10, 1-17.

LA RESISTENZA ALLE MALATTIE NEL SUINO PESANTE ITALIANO: UTILIZZO DEL MODELLO THRESHOLD PER LA STIMA DELLE COMPONENTI DI VARIANZA E DEL VALORE GENETICO DEI RIPRODUTTORI

USE OF THRESHOLD MODEL TO ESTIMATE VARIANCE COMPONENTS AND BREEDING VALUES FOR DISEASE RESISTANCE IN ITALIAN HEAVY PIGS

CAPPELLONI M.[1], GALLO M.[1], CESARANI A.[2,3]

[1] *Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS), Roma, 00198, Italia;*
[2] *Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari, Sassari 07100, Italia;*
[3] *Animal and Dairy Science Department, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA*

Parole Chiave: resistenza alle malattie, selezione genetica, modello threshold
Keywords: disease resistance, genetic selection, threshold model

RIASSUNTO
L'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) gestisce i programmi genetici delle razze Large White, Landrace e Duroc italiana principalmente orientati alle produzioni di prosciutti DOP. Accanto agli obiettivi tradizionali di selezione (ad es. incremento medio giornaliero e qualità della carcassa e delle carni) ANAS valuta l'inclusione della resistenza genetica nel proprio schema di selezione. L'obiettivo di questo studio è quello di stimare le componenti della varianza e i valori genetici (EBV) dei riproduttori utilizzando un modello threshold (TM) applicato alle malattie respiratorie (MR) e alle enteriti (ME). Nell'ambito delle prove del Sib Test svolte presso il centro genetico di ANAS nel periodo 1990-2021, sono state rilevate dai veterinari dell'Associazione 9.595 diagnosi di MR e 12.046 diagnosi di ME. Il carattere è stato registrato come variabile dicotomica: animali malati con 1 e animali sani con 2. È stato applicato un TM multi-razza con cui sono stati stimati valori di ereditabilità per le malattie respiratorie (8%) e per le enteriti (17%). Questo modello ha permesso una stima più precisa delle componenti di varianza e, allo stesso tempo, valori genetici molti simili a quelli stimati nell'analisi per singola razza. Inoltre, i risultati di TM e LM erano molto simili. I risultati dello studio dimostrano la possibilità di includere la selezione per la resistenza alle malattie nei programmi genetici delle razze tradizionali italiane per il suino pesante.

ABSTRACT
The Italian National Pig Breeders Association (ANAS) manages the breeding programs of the Italian Large White, Italian Landrace, and Italian Duroc breeds, mainly oriented to the production of PDO hams. ANAS is currently evaluating the inclusion of genetic resistance in its breeding scheme. This study aimed to estimate variance components and breeding values for disease resistance by threshold (TM) and linear (LM) models. During the sib test performed at the genetic center of ANAS from 1990 to 2021, 9,595 (respiratory diseases) and 12,046 (enteritis) diagnoses were collected by the ANAS veterinaries. The trait was recorded as a dichotomous variable: affected animals with 1, whereas healthy with 2. Low heritabilities were estimated for respiratory (0.08) and enteritis (0.17) with a multi-breed TM. This model led to more precise variance components estimation and, at the same time, to breeding values very close to the ones estimated in the single breed analysis.

Almost the same heritabilities were found using both TM and LM. Results of this study demonstrated the feasibility of including disease resistance among the breeding goals of the Italian traditional breeds for heavy pig production.

INTRODUZIONE

L'Associazione Nazionale Allevatori Suini (ANAS) gestisce i programmi del Libro genealogico che si articolano in programmi di miglioramento genetico per le tre razze del suino pesante (LWI, LI e DI) ed in programmi di conservazione genetica per le razze autoctone e locali. A partire dal 1988, su richiesta del Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (Mipaaf), è stato messo a punto uno specifico schema di selezione per il suino pesante, che riguarda le razze Large White, Landrace Duroc italiane. Gli obiettivi sono il mantenimento delle caratteristiche di idoneità delle carni e delle cosce alla stagionatura in prosciutti di qualità ed il miglioramento sostenibile dell'efficienza produttiva. L'attività di selezione si basa sulla valutazione genetica (Sib Test) presso il centro genetico ANAS. Per ogni verro candidato alla riproduzione, viene testato un gruppo di tre fratelli pieni (maschi e femmine) alimentati con un sistema "quasi ad libitum" (Kielanowski, 1965). A partire dal 2017, nell'ambito del PSRN 10.2, ANAS è impegnata nello sviluppo dei progetti SUIS e SUIS.2 (Suinicoltura Italiana Sostenibile), che hanno tra i vari obiettivi il miglioramento della robustezza e resistenza dei suini per contribuire alla riduzione dell'uso di antimicrobici. Tra le malattie che affliggono l'industria suinicola, i disturbi respiratori (MR) e le malattie enteriche (ME) stanno causando enormi perdite economiche in tutto il mondo (Gol et al., 2015). Pertanto, l'allevamento di suini più resistenti e resilienti assume una rilevante importanza sotto il profilo della sostenibilità economica ed etica della filiera delle produzioni tipiche di qualità. Infatti, gli effetti attesi sono il contenimento delle perdite, il miglioramento del benessere e delle prestazioni e la riduzione del ricorso all'uso degli antimicrobici, condizione fondamentale per la prevenzione del fenomeno dell'antibiotico resistenza. Non essendo praticabili prove di challenge (costose e difficilmente attuabili nelle condizioni di allevamento), sono stati utilizzati i dati dei trattamenti terapeutici praticati e registrati in condizioni di allevamento controllato presso il centro genetico ANAS. Le condizioni sperimentali delle prove al centro (gruppo di tre fratelli pieni coetanei allevati in settori di prova con frequenza quindicinale) e la quotidiana registrazione individuale dei trattamenti sanitari effettuati, ha permesso di disporre di dati affidabili che sono stati utilizzati per stimare la componente genetica della risposta degli animali alle patologie respiratorie ed enteriche.

MATERIALI E METODI

Nell'analisi sono stati considerati i dati del file storico dei trattamenti terapeutici praticati e registrati dai veterinari ANAS durante le prove del SIB dal 1990 al 2021. In questo periodo sono state rilevati 21.641 records sullo stato di salute degli animali. La prova SIB inizia all'età di circa 100 gg, dopo un periodo di acclimatamento di sette settimane, e termina al raggiungimento del peso di circa 155 Kg. Sulla base delle diagnosi registrate dai veterinari, sono stati considerati due gruppi di malattie: malattie dell'apparato respiratorio e malattie dell'apparato gastro-enterico. I soggetti con almeno un trattamento individuale o di massa registrato sono stati classificati "malati" e quelli senza trattamenti "sani". I caratteri oggetto dell'analisi sono stati trattati come binari: 1 per i soggetti trattati (malati) e 2 per i soggetti non trattati (sani). La Tabella 1 riporta la numerosità delle casistiche rilevate.

	Respiratorie				Enteriti		
	Non trattati (sani) N.	Trattati (malati) N.	Totali N.		Non trattati (sani) N.	Trattati (malati) N.	Totali N.
Large White	3.187	1.839	5.026		4.707	1.885	6.592
Landrace	996	801	1.797		1.606	703	2.309
Duroc	1.937	835	2.772		1.576	1.569	3.145
Totali	6.120	3.475	9.595		7.889	4.157	12.046

Tabella 1: Dimensioni del set di dati analizzato.
Table 1: Size of the analyzed dataset.

Analisi Statistica
Poiché il carattere studiato è stato valutato come variabile dicotomica (malato= 1; sano = 2), le componenti della varianza (VC) sono state stimate utilizzando il modello *Threshold* (TM), considerando il fenotipo come carattere binario. Dopo varie verifiche è stato utilizzato per l'elaborazione un modello BLUP *Threshold* Animal Model che considera i seguenti principali fattori: razza, sesso, settore di prova e nidiata. L'ereditabilità (h^2) stimata con TM è stata trasformata dalla scala di probabilità a scala normale (cioè tra 0 e 1) utilizzando l'equazione proposta da Dempster e Lerner (1950) e da Wray e Visscher (2015). I componenti della varianza sono stati stimati tramite un metodo di campionamento Gibbs con 100.000 round, 10.000 iterazioni scartate come burn-in, thin-in di 10 (salvando cioè 1 campione ogni 10 iterazioni). Il software utilizzato è stato thrgibbs1f90; le medie a posteriori (includendo l'intervallo di confidenza al 95%, CI95%) per tutti i parametri sono state calcolate utilizzando postgibbsf90. Tutte le routine sono state implementate nel programma BLUPF90 (Misztal et al., 2014).

RISULTATI
I caratteri indagati presentano una ereditabilità del 17% - forme enteriche - e del 8% - forme respiratorie. Si tratta di valori medio bassi che comunque consentono l'attuazione della selezione. I valori genetici stimati (EBV- *Estimated Breeding Value*) ottenuti per le due categorie di animali (trattati/malati e non trattati/sani) sono stati messi a confronto: gli EBV dei soggetti "sani" risultano mediamente più alti rispetto a quelli degli animali malati sia per le malattie respiratorie sia per le malattie enteriche. Si è proceduto, quindi, alla trasformazione degli EBV in indici tramite apposita standardizzazione. Gli indici sono espressi in unità di deviazione standard rispetto ad una media mobile della razza. I valori superiore allo 0 (zero) indicano che il riproduttore trasmette alla propria discendenza la probabilità di un minor fabbisogno di trattamenti terapeutici in virtù di una maggiore robustezza/resistenza. I due indici di resistenza alle malattie, respiratorie (RMR) ed enteriche (RME) saranno elaborati con cadenza quindicinale e saranno pubblicati per ogni verro sottoposto a valutazione genetica in stazione, assieme agli altri indici genetici SIB.

DISCUSSIONE
Le ereditabilità stimate nel presente studio sono della stessa entità di quelle riportate in letteratura per le malattie nei suini (es. Henryon et al., 2001) e in altre specie animali

(Snowder et al., 2006; Schneider et al., 2010). Per esempio, Henryon et al. (2001) hanno riportato ereditabilità di 0,12 e 0,16 per malattie respiratorie e diarrea.
L'ereditabilità poligenica di 0,29 è stata stimata per la rinite atrofica (cioè un disturbo respiratorio) da Okamura et al. (2012) in suini di razza Landrace. Per quanto riguarda le altre specie animali, Schneider et al. (2010) hanno stimato i parametri genetici per l'incidenza della malattia respiratoria bovina e hanno riportato stime di 0,10±0,11 e 0,02±0,06 rispettivamente nei vitelli Angus e Simmenthal pre-svezzamento. Snowder et al. (2006) hanno riportato stime di ereditabilità per la resistenza a RD in 9 razze bovine comprese tra 0,04 e 0,08 ± 0,01. Inoltre, le ereditabilità stimate nel presente studio sono simili a quelle riportate in altre specie zootecniche relativamente ai caratteri riproduttivi e funzionali, generalmente inferiori ai caratteri produttivi (Sewalem et al., 2013; Martin et al., 2018; Cesarani et al., 2020a).

CONCLUSIONI

I risultati del presente studio dimostrano la possibilità di includere la selezione per la resistenza alle malattie nei programmi genetici delle tre razze italiane per il suino pesante. È stato dimostrato che l'analisi multi-razza consente di stimare ereditabilità più precise senza modificare i valori genetici dei riproduttori o il rank degli animali. La disponibilità di questi due nuovi indici genetici consentirà la scelta e la diffusione dei riproduttori, sulla base dei dati del centro genetico ANAS. Ciò potrà contribuire alla riduzione dell'uso di antimicrobici in linea con quanto previsto dalla Strategia *Farm to Fork* e dai Piani nazionali messi in atto contro il fenomeno dell'antibiotico resistenza. Infine, la possibilità di disporre di animali più resistenti permetterà migliori prestazioni dal punto di vista quantitativo e qualitativo con la diretta conseguenza della riduzione degli scarti, delle minori spese per i trattamenti dei soggetti malati, della riduzione dell'impatto ambientale ed in ultima istanza di rafforzare la sostenibilità dell'allevamento del suino pesante italiano.

BIBLIOGRAFIA

1. Cesarani A, Gaspa G, Masuda Y, Degano L, Vicario D, Lourenco DA, Macciotta NPP. 2020a. Variance components using genomic information for 2 functional traits in Italian Simmental cattle: Calving interval and lactation persistency. J Dairy Sci. 103(6):5227-5233.
2. Dempster ER, Lerner IM. 1950. Heritability of threshold characters. Genetics 35(2):212.
3. Gol S, Estany J, Fraile LJ, Pena RN. 2015. Expression profiling of the GBP 1 gene as a candidate gene for porcine reproductive and respiratory syndrome resistance. Anim Genet. 46(6):599-606.
4. Henryon M, Berg P, Jensen J, Andersen S. 2001. Genetic variation for resistance to clinical and subclinical diseases exists in growing pigs. Anim Sci. 73(3):375-387.
5. Kielanowski J. 1965. Estimates of the energy cost of protein deposition in growing animals. Energy metabolism, 13-20.
6. Martin P, Barkema HW, Brito LF, Narayana SG, Miglior F. 2018. Symposium review: novel strategies to genetically improve mastitis resistance in dairy cattle. J Dairy Sci. 101(3):2724-2736.
7. Misztal I, Tsuruta S, Lourenco D, Aguilar I, Legarra A, Vitezica Z. 2014. Manual for BLUPF90 family of programs. Retrieved from http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf 90_all7.pdf
8. Okamura T, Onodera W, Tayama T, Kadowaki H, Kojima-Shibata C, Suzuki E, Uemoto Y, Mikawa S, Hayashi T, Awata T, Fujishima-Kanaya N, Mikawa A, Uenishi H, Suzuki K. 2012. A genome-wide scan for quantitative trait loci affecting respiratory disease and immune capacity in Landrace pigs. Anim Genet. 43(6):721-729.

9. Schneider MJ, Tait Jr RG, Ruble MV, Busby WD, Reecy JM. 2010. Evaluation of fixed sources of variation and estimation of genetic parameters for incidence of bovine respiratory disease in preweaned calves and feedlot cattle. J Anim Sci. 88(4):1220-1228.
10. Sewalem A, Miglior F, Kistemaker GJ. 2013. Genetic parameters of milking temperament and milking speed in Canadian Holsteins. J Dairy Sci. 94(1):512-516.
11. Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. J Anim Sci. 84(8):1999-2008.
12. Wray NR, Visscher PM. 2015. Quantitative genetics of disease traits. J Anim Breed Genet. 132(2):198-203.

CORRELAZIONE TRA LE LESIONI DELLA CARCASSA E LE LESIONI ANATOMOPATOLOGICHE POLMONARI RILEVATE AL MACELLO IN SUINI SOTTOPOSTI O NO A CAUDOTOMIA

CORRELATION BETWEEN CARCASS AND ANATOMOPATHOLOGICAL PULMONARY LESIONS DETECTED AT THE SLAUGHTERHOUSE IN PIGS SUBJECTED OR NOT TO TAIL DOCKING

AMATUCCI L.[1], BOSCO C.[2], LUISE D.[1], LUPPI A.[2], VIRDIS S.[1], TREVISI P.[1]

[1]*Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari – DISTAL, Università di Bologna.*
[2]*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna -IZLER*

Parole chiave: suino, lesioni, macello
Keywords: pig, lesions, slaughterhouse

RIASSUNTO
Questo studio riporta i dati di prevalenza, gravità e associazione tra pleuriti, broncopolmoniti (*enzootic pneumonia like lesions*), lesioni alla coda e sul corpo di suini attraverso l'ispezione in macelli italiani. Inoltre, è stato valutato l'effetto della caudotomia e della stagione di macellazione sui parametri in studio. Tra il 2019 e il 2022 sono state valutate le lesioni broncopolmonari e pleuriche, le lesioni alla coda e sul corpo di suini appartenenti a 151 partite provenienti da 94 allevamenti tra i fornitori di macelli italiani per un totale di 18.976 capi. Le lesioni broncopolmonari sono state punteggiate secondo il metodo *Madec and Derrien* e le pleuriti applicando la griglia SPES. Per le lesioni di coda e corpo è stato calcolato un indice di lesione per ogni area. Nella stagione calda (periodo giugno-settembre) la prevalenza di lesioni nelle carcasse era maggiore (P<0,0001). La presenza di coda lunga ha aumentato l'LSI (*Lesion Score Index*) della coda (P<0,0001) e la prevalenza di pleuriti (P=0,04). Tra gli animali a coda lunga, c'è stata una correlazione tra LSI della coda e prevalenza di lesioni polmonari (P<0,0001; R=0,355), prevalenza di pleuriti (P<0,0001; R=0,377) e indice appi (P<0,0001; R=0,371). In conclusione, l'assenza di caudotomia e la stagione calda risultano essere fattori di rischio per la prevalenza di lesioni alla coda. La presenza di coda lunga risulta essere correlata con la prevalenza di lesioni polmonari e pleuriti.

ABSTRACT
The aim of the study was to measure the prevalence of pleurisy, bronchopneumonia (enzootic pneumonia like lesions) and lesions on tail and body of pigs through the inspection in Italian abattoirs. Additionally, as secondary aim, the effect of tail docking and season on prevalence of pleurisy, pneumonia and lesions on tail and body were investigated. For this purpose, a total 18.976 caraccas belonged to 151 batches from 94 farms were inspected in Italian slaughterhouses between 2019 and 2022. Bronchopulmonary lesions were scored according to the Madec and Derrien method, pleurisy was scored using the SPES scale. For tail and body lesions the Lesion Score Index (LSI) was calculated for each area. The warm season increased the percentage of lesions in carcasses (P<0.0001). The presence of a long tail increased the LSI of the tail (P<0.0001) and the prevalence of pleuritis (P=0.04). Among carcass with long tail, a positive correlation between LSI tail lesions and the prevalence of lung lesions (P<0.0001; R=0.355), prevalence of pleuritis (P<0.0001; R=0.377) and appi

index (P<0.0001; R=0.371) was observed. In conclusion, the presence of the long tail and the warm season can be considered as risk factors for the prevalence of tail lesion. The long tail seemed to be correlated with the prevalence of lung lesions and pleuritis even if the low coefficient indicated that other factors are involved.

INTRODUZIONE

Il duplice scopo dell'ispezione delle carcasse in macello è quello di limitare il rischio di possibili infezioni zoonotiche e valutare la presenza di malattie nell'animale anche se non hanno conseguenze sulla qualità igienico-sanitaria della carne e quindi sulla sua immissione in commercio (EFSA, 2011). La valutazione delle lesioni polmonari e delle pleuriti al macello è un importante strumento di monitoraggio in quanto permette di valutare l'incidenza e la gravità delle lesioni, ma anche di stimare l'impatto economico delle patologie respiratorie (Ostanello et al., 2007).

Anche l'osservazione delle lesioni della carcassa in macello è considerata un'opportunità per misurare lo stato di benessere degli animali prima del loro arrivo in macello (Teixeira et al., 2016). Le lesioni della coda, considerate oggi uno dei principali problemi riguardanti il benessere dei suini allevati, derivano da un comportamento alterato, che può essere favorito da condizioni di stress e sono considerate ad oggi uno dei migliori indicatori di benessere nei suini (EFSA, 2007). Le lesioni da morso della coda, specialmente se severe, possono comportare una perdita in carne a seguito della necessità di rifilatura e dunque ad un minor peso della carcassa (van Staaveren et al., 2016).

Sia le patologie respiratorie che le lesioni della coda sono tra i fattori associati alla riduzione di performance (van Staaveren et al., 2016). L'esistenza di una correlazione tra malattia respiratoria e lesioni della coda non è stata confermata (EFSA, 2014) e le recenti indicazioni Ministeriali sono per mantenere una quota di animali allevati a coda lunga.

I dati riportati in letteratura sono scarsi e contraddittori. Infatti, vi sono evidenze dell'associazione positiva tra la presenza di lesioni alla coda e la presenza di pleuriti e polmoniti, che indicano come il rischio aumenti con l'aumentare della severità delle lesioni (Teixeira et al., 2016), altri studi invece non hanno riportato questa corrispondenza (van Staaveren et al., 2016).

L'obbiettivo di questo studio è stato di valutare, al macello, la prevalenza e la gravità di lesioni polmonari, pleuriti e lesioni sul corpo oltre che valutare l'effetto della caudotomia e della stagione di macellazione sulla prevalenza di lesioni esterne, polmoniti e pleuriti. Infine, è stata valutata la correlazione tra la presenza di lesioni alla coda e la presenza di pleuriti e polmoniti. Lo studio si è basato sul metodo di valutazione integrata messo a punto nel progetto di Filiera del PSR Emilia-Romagna Focus area 3A-Operazione 16.01.1 (WELDONEPIG).

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto tra giugno 2019 e marzo 2022, in due macelli di suini, in 19 giornate diverse. Sono state valutate complessivamente 151 partite, di cui 132 a coda tagliata e 19 a coda lunga per un totale di 18.976 carcasse provenienti da 94 allevamenti scelti casualmente tra i fornitori dei macelli. Sulle partite sono stati valutati i seguenti parametri: lesioni broncopolmonari e pleuriche, lesioni sulla coda e sul corpo.

Le partite sono state divise in base alla stagione di macellazione (stagione calda: giugno-settembre; stagione fredda: ottobre-marzo).

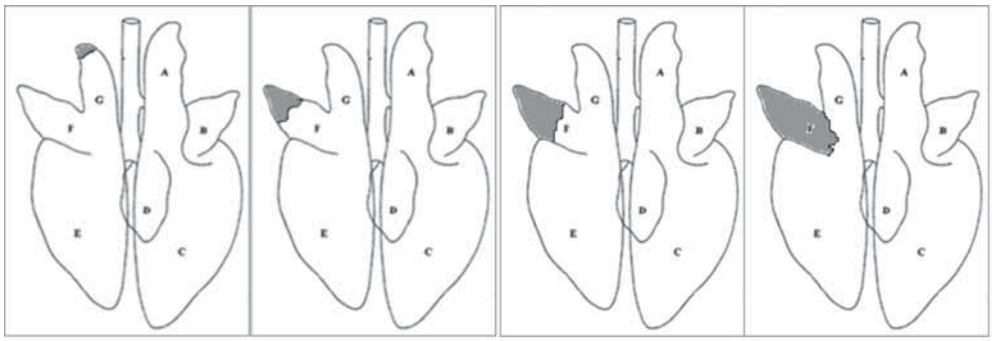
Le lesioni broncopolmonari sono state valutate, per ciascun lobo, con punteggio da 0 a 4 (0 = assenza lesione; 4 = lesioni a carico del lobo polmonare interessano una superficie >75%), sino ad un massimo punteggio di 28, secondo il metodo Madec et al., (1981) (Ta-

bella e Figura 1). Infine, è stato calcolato il valore medio delle lesioni broncopolmonari per partita (somma della media del punteggio di ciascun lobo/numero di polmoni esaminati).
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 *A. pleuropneumoniae*. L'indice APPI viene calcolato applicando la seguente formula: *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
Table 1. The modified Madec's grid for Enzootic pneumonia like lesions evaluation (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 cardiaco 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)

I punteggi delle lesioni a corpo e coda andavano da 0 a 2 secondo il metodo proposto da Welfare Quality® (2009). I punteggi per le lesioni alla coda erano: 0 = assenza di lesioni; 1 = morso superficiale lungo la lunghezza della coda ma nessuna traccia di gonfiore; 2= lesione aperta visibile sulla coda, presenza di cicatrici, gonfiore o mancanza parziale della coda. Per le lesioni del corpo è stato valutato un lato della carcassa e le lesioni sono state valutate in 5 aree separate (orecchio, quarto anteriore, tronco, quarto posteriore e arti). Il punteggio era: 0 = fino a 4 lesioni visibili; 1 = da 5 a 10 lesioni visibili; 2 = da 11 a 15 lesioni visibili.
I risultati di ciascuna partita sono stati espressi come prevalenza dei punteggi ottenuti (0, 1, 2). È stato successivamente calcolato un indice di lesione (Lesion score index: *[% di lesioni tipo 1 + (2*% lesioni tipo 2)]*).
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, Denmarc). I risultati sono espressi come media della singola partita.

STATISTICA

Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando i software Excel e R (R Core Team, 2017). La partita è stata utilizzata come unità statistica. I dati sono stati analizzati utilizzando un modello lineare GLM nel quale la lunghezza della coda (corta o lunga), la stagione di macellazione sono stati inclusi come fattori fissi. La correlazione tra le prevalenze e gli indici di lesioni anatomopatologiche e lesioni alla coda è stata testata utilizzando le correlazioni di Pearson (pacchetto Hmisc in R) nel dataset completo e nel dataset costituito solo da carcasse derivate da animali a coda lunga. Valori con un $P \leq 0{,}05$ sono stati considerati significativi mentre con un $0.10 \leq P > 0{,}05$ è stato considerato una tendenza.

RISULTATI

I risultati dell'analisi descrittiva per la qualità della carcassa e le lesioni corporee, sono riportati in Tabella 3. Il peso medio di carcassa a freddo era di 138,76 Kg e una percentuale di magro di 52,19%.
Per quanto riguarda le orecchie, l'LSI medio era di 12,37, con una media di lesioni con punteggio 0 molto alta (91,22%) e la media di lesioni 1 o 2 più contenuta (5,10% e 3,68%; rispettivamente). Il quarto anteriore presentava un LSI medio di 22,66, mentre il tronco presentava un LSI di 23,75. Per il quarto posteriore, l'indice di punteggio di lesione era di 8,79%, mentre per gli arti dell'1,11%. Per quanto riguarda la coda, l'LSI era di 49,5, le lesioni con punteggio 1 e 2 erano maggiori rispetto alle altre parti del corpo (22,17% e 13,83%; rispettivamente).

Tabella 3. Analisi descrittiva sulle lesioni nelle varie parti del corpo.
Table 3. Descriptive analysis of lesions in various parts of the body.

Variable	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Media peso bilancia, Kg	139,92	0,90	6,85	119,91	140,06	152,31
Media peso freddo, Kg	138,76	0,60	6,79	117,51	137,97	153,35
Media % Magro	52,19	0,13	1,57	48,08	52,22	57
Orecchie 0, %	91,22	0,95	11,72	3,18	94,85	100
Orecchie 1, %	5,10	0,76	9,28	0	2,68	96,83
Orecchie 2, %	3,68	0,40	4,93	0	1,94	23,64
LSI orecchie[1,2]	12,37	1,24	15,35	0	7,66	96,83
Q_ant 0, %	81,28	1,04	12,82	44	85,09	100
Q_ant 1, %	10,64	0,61	7,50	0	8,80	35
Q_ant 2, %	8,10	0,62	7,67	0	5,88	32
LSI Q_ant[1,2]	26,66	1,61	19,81	0	19,65	84
Tronco 0, %	81,95	0,92	11,27	41	84	100
Tronco 1, %	11,71	0,64	7,88	0	11	36,92
Tronco 2, %	6,10	0,46	5,69	0	4,35	36
LSI tronco[1,2]	23,75	1,31	16,18	0	20,98	95
Q_post 0, %	93,14	0,49	5,98	63	94,44	100
Q_post 1, %	4,84	0,36	4,47	0	3,90	24
Q_post 2, %	2,00	0,21	2,62	0	1,03	16,67
LSI Q_post[1,2]	8,79	0,65	8,06	0	6,96	50
Arti 0, %	99,19	0,11	1,36	93,10	100	100
Arti 1, %	0,48	0,09	1,10	0	0	6,90
Arti 2, %	0,32	0,06	0,70	0	0	4,90
LSI arti[1,2]	1,11	0,15	1,88	0	0	9,80
Coda 0, %	63,99	2,18	26,85	0	70,34	99,18
Coda 1, %	22,17	1,04	12,79	0	22,22	81,62
Coda 2, %	13,83	2,12	26,01	0	3,33	100
LSI coda[1,2]	49,50	4,16	51,24	0	32	200

[1]LSI: Lesion Score Index; [2]I valori sono calcolati su un range da 0 a 200 considerando la prevalenza e la gravità delle lesioni, dove 0 è l'assenza e 200 tutte le carcasse nel lotto mostrano lesioni gravi.
[1]LSI: Lesion Score Index; [2]Values are calculated on a range from 0 to 200 considering the prevalence and severity of lesions, where 0 is absence and 200 all carcasses in the batch show severe lesions.

I risultati dell'analisi descrittiva delle partite per indici e prevalenze di lesioni polmonari e pleuriche sono riportati in Tabella 4. La prevalenza generale di lesioni broncopolmonari e di pleuriti (ventro-craniali e dorso-caudali) sono state rispettivamente del 27,01% e 37,27% mentre quella delle sole pleuriti dorso-caudali del 23,81%. Le medie Madec e SPES, considerando tutte le partite incluse nello studio, sono state rispettivamente 0,85 e 0,81, mentre la media dell'indice Appi è risultata essere di 0,67.

Tabella 4. Analisi descrittiva su indici e prevalenze di lesioni polmonari e pleuriti.
Table 4. Descriptive analysis of indexes and prevalence of lung lesions and pleuritis.

Variable	Mean	SE Mean	StDev	Minimum	Median	Maximum
Media Madec	0,85	0,07	0,77	0	0,67	4,87
Prevalenza lesioni polmonari, %	27,01	1,31	15,19	0	26,67	74,56
Media Spes	0,81	0,04	0,42	0,02	0,78	1,93
Prevalenza pleuriti, %	37,27	1,47	17,10	2,08	36,61	85
Indice Appi	0,67	0,04	0,41	0	0,61	2,15
Pleuriti dorso-caudali (score ≥2), %	23,81	1,19	13,79	0	22	60

I risultati dell'analisi statistica sull'effetto della lunghezza della coda e della stagione sulle lesioni di corpo e coda e rispettivi indici LSI sono riportati in Tabella 5. La coda integra ha aumentato la presenza di lesioni alla coda di tipo 1 (P=0,003), di tipo 2 (P<0,0001) e di conseguenza anche l'LSI della coda (P<0,0001), mentre la maggior parte di code con punteggio 0 apparteneva ad animali con la coda tagliata (P<0,0001). La lunghezza della coda non ha influenzato significativamente la prevalenza di lesioni in nessuna altra parte del corpo.
La stagione calda ha aumentato la prevalenza di lesioni 1 e 2 e ridotto le lesioni con punteggi 0 per orecchie, quarto anteriore, tronco e quarto posteriore (P<0,0001). Per le lesioni sulla coda, la stagione calda ha aumentato la prevalenza di lesioni di tipo 1 (P=0,014). Al contrario, la stagione fredda ha favorito la presenza di lesioni di tipo 1 sugli arti (P=0,013).

Tabella 5. Effetto della lunghezza della coda e della stagione su lesioni e LSI (Lesion Score Index) di coda e corpo.
Table 5. Effect of type of tail and season on lesions and LSI (Lesion Score Index) of tail and body.

Item	Coda		SEM	Stagione		SEM	P-value	
	C	L		Freddo	Caldo		Coda	Stagione
Media peso bilancia, Kg	140,43	138,81	1,62	140,63	138,61	1,54	0,511	0,286
Media peso freddo, Kg	139,31	137,73	1,37	139,53	137,52	1,26	0,481	0,085
Media % magro	52,02	52,51	0,24	52,26	52,27	0,22	0,18	0,96
Orecchie 0, %	89,09	93,3	1,67	95,49	86,9	1,54	0,115	<0,0001
Orecchie 1, %	6,22	2,99	1,48	2,25	6,96	1,37	0,18	0,002
Orecchie 2, %	4,67	3,73	0,6	2,27	6,13	0,56	0,3	<0,0001
LSI orecchie[1,2]	15,37	10,26	2,02	6,8	18,83	1,87	0,109	<0,0001
Q_ant 0, %	78,65	79,7	1,61	85,04	73,31	1,49	0,66	<0,0001
Q_ant 1, %	11,78	11,14	0,93	9,08	13,84	0,85	0,658	<0,0001
Q_ant 2, %	9,58	9,17	1,03	5,87	12,88	0,95	0,77	<0,0001
LSI q_ant[1,2]	30,43	28,97	2,66	20,83	38,57	2,45	0,7	<0,0001
Tronco 0, %	80,61	79,2	1,46	84,36	75,45	1,35	0,52	<0,0001
Tronco 1, %	12,25	13	1,06	10,64	14,61	0,98	0,655	<0,0001
Tronco 2, %	6,83	8,47	0,81	5,19	10,1	350,9	0,17	<0,0001
LSI Tronco[1,2]	25,61	29,62	2,24	21,03	24,2	2,07	0,23	<0,0001
Q_post 0, %	92,34	91,46	0,81	94,14	89,65	0,74	0,47	<0,0001
Q_post 1, %	5,24	5,65	0,6	4,39	6,51	0,55	0,666	<0,0001
Q_post 2, %	2,37	2,85	0,4	1,46	3,76	0,37	0,4	<0,0001
LSI q_post[1,2]	9,81	11,17	1,16	7,31	13,67	1,07	0,42	<0,0001
Arti 0, %	99,25	99,18	0,21	99,1	99,34	0,19	0,83	0,22
Arti 1, %	0,43	0,23	0,15	0,52	0,14	0,14	0,42	0,013
Arti 2, %	0,27	0,49	0,12	0,37	0,4	0,11	0,24	0,75
LSI arti[1,2]	0,97	1,2	0,3	1,26	0,92	0,28	0,618	0,23
Coda 0, %	71,8	0	1,95	36,43	31,67	1,8	<0,0001	0,011
Coda 1, %	23,1	31,35	1,72	25,04	29,32	1,59	0,003	0,014
Coda 2, %	5,17	72,14	2	38,46	38,86	1,85	<0,0001	0,84
LSI coda[1,2]	33	175,3	3,56	101,9	106,4	3,28	<0,0001	0,19

[1]LSI: Lesion Score Index; [2]I valori sono calcolati su un range da 0 a 200 considerando la prevalenza e la gravità delle lesioni, dove 0 è l'assenza e 200 tutte le carcasse nel lotto mostrano lesioni gravi.
[1]LSI: Lesion Score Index; [2]Values are calculated on a range from 0 to 200 considering the prevalence and severity of lesions, where 0 is absence and 200 all carcasses in the batch show severe lesions.

L'effetto della lunghezza della coda e della stagione su lesioni polmonari è riportato in Tabella 6. La prevalenza di pleuriti è aumentata significativamente in presenza di coda lunga (P=0,04) mentre la prevalenza di polmoniti e gli indici (Madec, SPES e Appi) non sono stati influenzati dalla lunghezza della coda. Allo stesso modo nessun parametro anatomopatologico è risultato essere influenzato dalla stagione.

Tabella 6. Effetto della lunghezza della coda e della stagione su indici e prevalenze di lesioni polmonari e pleuriti.
Table 6. Effect of type of tail and season on indices and prevalence of lung lesions and pleuritis.

Item	Coda		SEM	Stagione		SEM	P-Value	
	C	L		Freddo	Caldo		Coda	Stagione
Media Madec	0,86	1,04	0,15	0,97	0,94	0,14	0,43	0,83
Prevalenza lesioni polmonari, %	27,39	30,58	2,78	30,4	27,57	2,56	0,47	0,27
Media Spes	0,81	1	0,08	0,86	0,95	0,08	0,13	0,26
Prevalenza pleuriti, %	36,74	47,9	3,31	40,86	43,78	3,05	0,04	0,34
Indice Appi	0,68	0,81	0,08	0,7	0,79	0,07	0,31	0,19
Pleuriti dorso-caudali (score ≥2), %	23,95	23,58	2,42	22,9	24,63	2,25	0,92	0,47

Sono inoltre state individuate delle correlazioni positive tra gli LSI delle lesioni esterne; in particolare, le più alte erano tra LSI del quarto anteriore e LSI delle orecchie (P>0,0001; R=0,618) e tra LSI del quarto posteriore e LSI del tronco (P<0,0001; R=0,694). Correlazioni più basse sono state identificate tra la prevalenza di lesioni polmonari e LSI del quarto anteriore (P<0,0001; R=0,33) e tra l'indice Appi e LSI del quarto anteriore (P<0,0001; R=0,328). Come previsto alte correlazioni sono state evidenziate tra indice Appi e lesioni polmonari (P<0,0001; R=0,793) e pleuriti (P<0,0001; R=0,844) e anche tra queste ultime due (P<0,0001; R=0,696).
Considerando soltanto gli animali a coda lunga è stata osservata una correlazione positiva tra LSI della coda e prevalenza di lesioni polmonari (P<0,0001; R=0,355), prevalenza di pleuriti (P<0,0001; R=0,377) e l'indice appi (P<0,0001; R=0,371). Questa correlazione non si è verificata considerando soltanto gli animali a coda corta.

DISCUSSIONE

I suini oggetto del monitoraggio hanno evidenziato una prevalenza di lesioni broncopolmonari del 27,01%. Un dato, questo, in riduzione se comparato ai risultati di uno studio condotto nel 2008 (Merialdi et al., 2012) in Italia, confermato in Pangallo et al. (2019), e recentemente aggiornato da Vitali et al., nel 2021, in cui la prevalenza delle lesioni broncopolmonari, riferibili a polmonite enzootica, era del 46,4%, del 46% e del 30,2% rispettivamente. Per quanto riguarda la gravità delle lesioni osservate si riporta una ulteriore flessione della media Madec, pari a 0,85 nel presente lavoro, se comparata con quanto riportato negli stessi studi, dove la media Madec era risultata 1,03, 1,09 e 0,91, rispettivamente. Il dato di prevalenza e quello relativo alla media Madec confermano quanto osservato da Vitali et al. (2021), fornendo una fotografia aggiornata relativa al monitoraggio della polmonite enzootica in suini allevati in Italia.
Un aspetto interessante è dato dalla percentuale totale delle pleuriti che nel presente studio si assesta al 37,27%. Anche questo dato appare in netto calo, se confrontato con i risultati

ottenuti negli anni 2008-2011, con valori rispettivamente del 47,5%, 42,5% (Luppi et al., 2011; Merialdi et al., 2012) e in linea con quanto riportato da Vitali et al. nel 2021 (38,4%). Per quanto riguarda il rilievo delle pleuriti, i dati ottenuti, indicano la presenza di pleuriti dorso-caudali (punteggio ≥2) nel 23,81% dei polmoni esaminati, fortemente indicative di precedenti infezioni da *Actinobacillus pleuropneumoniae* (App). Questo dato è in calo rispetto alla 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) del 24,2% e descritta da Vitali et al., 2021 del 25,7%. Non disponendo di ulteriori dati relativi allo stato sanitario delle partite nei 9 mesi prima della macellazione, compreso l'impiego della vaccinazione nei confronti della pleuropolmonite da App, di cui le lesioni pleuriche fibrose dorso-caudali costituiscono l'evoluzione cronica, non è possibile eseguire una valutazione attendibile sulle motivazioni della riduzione del dato osservato nel presente lavoro, che rimane pertanto descrittivo dell'attuale situazione generale.
L'assenza di caudotomia ha visto un aumento statisticamente significativo dell'LSI (*Lesion Score Index*) della coda rispetto agli animali a coda corta. Altri autori sostengono che le lesioni alla coda sono causate da diversi fattori, valutati in allevamento, uno dei quali è anche la lunghezza della coda (EFSA, 2007; Scollo et al., 2016), a conferma di quanto osservato nel presente studio. Questo dimostra l'importanza del monitoraggio delle lesioni in macello, che potrebbe aiutare a valutare la situazione di benessere in allevamento.
L'assenza di caudotomia è risultata anche associata ad un aumento statisticamente significativo della prevalenza di lesioni polmonari e pleuriti. Questo risultato è in linea con lo studio di Teixeira et al. (2016), i quali sostengono che l'alta prevalenza di pleuriti e polmoniti nei lotti con gravi lesioni alla coda dimostra l'associazione tra salute e benessere negli allevamenti suini. Infatti, tale correlazione potrebbe essere spiegata dalla presenza di fattori di rischio comuni per la formazione di lesioni alla coda e per l'incremento di lesioni polmonari e pleuriche, ciò potrebbe dipendere dall'effetto immunosoppressivi dello stress che favorisce l'insorgenza di patologie (Teixeira et al., 2016). Per contro, van Staaveren et al. (2016) non riportano invece questa associazione.
In conclusione, la presenza di coda lunga e la stagione calda possono essere considerati dei fattori di rischio per la prevalenza di lesioni alla coda. La presenza di coda lunga sembra essere inoltre correlata con la prevalenza di lesioni polmonari e pleuriti anche se i coefficienti sono piuttosto bassi, ad indicare il coinvolgimento di altri fattori nell'insorgenza di tali lesioni.

RINGRAZIAMENTI
Progetto WELLDONEPIG R.E.R.* 16.1.01 – FA 3A (determinazione N17611 - 30/09/2019) PSR Regione Emilia-Romagna.
Al Dr. Paolo Bonilauri – Sezione di Reggio Emilia IZSLER per il supporto tecnico.

BIBLIOGRAFIA
1. Dottori M., Nigrelli A.D., Bonilauri P., et al. (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.
2. 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.
3. EFSA (2011) Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). EFSA J. 9, 2351

4. 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.
5. Luppi A., Bonilauri P., Merialdi G., and 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.
6. Madec F., Derrien H. (1981) Fréquence, intensité et localisation des lésions pulmonaires chez le porc charchutier: Résultats d'une première série d'observations en abattoir. *Journées de la Recherche Porcine en France.* 13 : 231–236.
7. Merialdi G., Dottori M., Bonilauri P., et al. (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.
8. Ostanello F., Dottori M., Gusmara C., et al. (2007) Pneumonia disease assessment using a slaughterhouse lung-scoring method. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 54:70-5.
9. Pangallo G., Bonilauri P., De Lorenzi G., et al. (2019) Polmonite enzootica: monitoraggio delle lesioni broncopolmonari in suini macellati nel periodo 2012-2018. In Atti della Soceità 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.
10. 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.
11. Teixeira D.L., Harley S., Hanlon A., et al. (2016). Study on the Association between Tail Lesion Score, Cold Carcass Weight, and Viscera Condemnations in Slaughter Pigs. *Front Vet Sci*. 3:24.
12. Van Staaveren N., Vale A.P., Manzanilla E.G., et al. (2016) Relationship between tail lesions and lung health in slaughter pigs. *Prev Vet Med*. 127, 21–26.
13. Vitali M., Luppi A., Bonilauri P., et al. (2021) Benchmarking of anatomopathological lesions assessed at slaughter and their association with tail lesions and carcass traits in heavy pigs. *Ital J Anim Sci*. 20,1103-1113.

VALUTAZIONE DEL CONSUMO DI ANTIBIOTICO IN ALLEVAMENTO SUINICOLO E ANTIBIOTICO-RESISTENZA IN *ESCHERICHIA COLI* INDICATORI FECALI: DATI PRELIMINARI IN TRE ALLEVAMENTI DELL'EMILIA ROMAGNA

ANTIBIOTIC USE AND ANTIBIOTIC-RESISTANCE IN ESCHERICHIA COLI FAECAL INDICATORS: PRELIMINARY RESULTS OF THREE FARMS IN EMILIA ROMAGNA (ITALY)

DE BENE A.F., BOSCO C., DE LUCIA A., MATTEUZZI A., LUPPI A., SCALI F., RUGNA G., BASSI P.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia E Dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", Brescia

Parole chiave: Antibioticoresistenza, Escherichia coli, Suini
Keywords: Antibiotic – Resistance, Escherichia Coli, Pigs

RIASSUNTO
La somministrazione di antibiotico costituisce un fattore di rischio per la selezione e diffusione di batteri antibiotico resistenti. In questo studio si riportano i risultati preliminari di un progetto di Ricerca Corrente (IZSLERPRC2019003), ottenuti valutando il consumo di antibiotico (Treatment Index-TI/100 giorni) e la sensibilità a differenti antibiotici (MIC90 e MBC90) in *E. coli* indicatori fecali prelevati da suinetti sottoscrofa e svezzati in tre aziende della Regione Emilia-Romagna nel 2020. La categoria degli svezzati è risultata quella più ampliamente trattata con antibiotici, le molecole più utilizzate sono state le aminopenicilline. Si riporta l'impiego di *Highest Priority Critically Important Antimicrobials* (HPCIAs) in almeno una categoria produttiva per azienda. La via di somministrazione degli antibiotici più utilizzata è risultata quella orale, in particolare per gli svezzati. Il maggior numero di resistenze è stato riscontrato per ampicillina, seguita da tetraciclina, sulfametoxazolo e trimetoprim, sia per gli svezzati che per i sottoscrofa, mente livelli di resistenza differenti nei tre allevamenti sono stati riscontrati per gentamicina, amikacina e cloramfenicolo. Riguardo agli HPCIAs le resistenze più numerose sono state rinvenute per chinoloni e fluorochinoloni, seguite da quella per i macrolidi. In molti casi l'insorgenza di resistenze per determinate molecole sembra avere correlazione col consumo dell'antibiotico (soprattutto per ampicillina e gentamicina), in altri non sembra esserci correlazione: questo pone l'accento sulla complessità del meccanismo di insorgenza delle resistenze e sui numerosi fattori che collaborano al processo.

ABSTRACT
The administration of antibiotics is a risk factor for the selection and spread of resistant antibiotic bacteria. This study reports the preliminary results of a Project supported by National Health Ministry (IZSLERPRC2019003), obtained by evaluating the antibiotic use (Treatment Index-TI/100 days) in 2020 of three farms located in Emilia-Romagna (Italy) and the antibiotic resistance (MIC90 and MBC90) in fecal indicator *E. coli* collected from piglets and weaners from the same farms. When examined by pig age class weaner pigs were the most treated with antibiotics compared to piglets, while aminopenicillins were the most molecules used. The use of HPCIAs in at least one production category per farm was observed. The most used route of administration of antibiotics was the oral

one, particularly for weaners. A high prevalence of resistance was found for ampicillin, followed by tetracycline, sulfamethoxazole and trimethoprim., for both weaners and piglets, while different resistance levels were found for gentamicin, amikacin and chloramphenicol in all the three farms. Regarding HPCIAs, most resistance was found to quinolones and fluoroquinolones, followed by macrolides. For some antibiotics (mainly ampicillin and gentamicin) the onset of resistance to certain molecules appears to be correlated to the consumption, this relationship is not clear for other molecules. These preliminary results highlight the complexity of the mechanisms that contribute to the antimicrobial resistance.

INTRODUZIONE

Il consumo di antibiotico in allevamento suinicolo è prevalentemente concentrato nelle fasi sottoscrofa e post-svezzamento (Bassi *et al*., 2021), dove si registra solitamente anche il maggior consumo di molecole considerate ad elevata priorità per il consumo umano (HPCIAs – *Highest Priority Critically Important Antimicrobials*, (WHO, 2018), ovvero cefalosporine di III e IV generazione, chinoloni e fluorochinoloni, polimixine (colistina) e macrolidi.

La somministrazione di antibiotico, soprattutto quando avviene per via orale, oltre a trattare gli agenti patogeni bersaglio, influisce sulla selezione di microrganismi commensali che possiedono meccanismi di resistenza, promuovendone di conseguenza la propagazione. La comparsa di queste resistenze può essere saggiata su microrganismi normalmente isolabili in animali sani e facenti parte della flora commensale (indicatori) tramite determinazione della MIC (Minima Concentrazione Inibente) che, confrontata con criteri interpretativi specifici (Break Point – BP), permette di classificare i batteri testati in Sensibili, Intermedi o Resistenti (Silley, 2012). I valori di BP maggiormente usati sono stati calcolati per diverse specie batteriche, specifiche molecole antibiotiche e, quando disponibili, per le diverse specie animali, e riportati nelle linee guida stilate dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e dall'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). L'EUCAST distingue la resistenza clinica, a cui fanno riferimento i break point clinici, dalla resistenza microbiologica, a cui fanno riferimento i valori di cut-off epidemiologici. Questi ultimi, definiti anche ECOFFs, si riferiscono ai ceppi selvaggi o *wild type*, cioè a dei ceppi che non hanno mai mostrato resistenza acquisita nei confronti del farmaco in esame. Oltre alla MIC esiste un altro indice che descrive il comportamento del batterio verso il farmaco, ovvero la Concentrazione Minima Battericida (MBC): questa rappresenta la dose più bassa di farmaco in grado di provocare la morte del 99,9% dei batteri presenti (Poli *et al*., 2002). Generalmente la MBC tende ad essere più elevata rispetto alla MIC per le molecole ad azione batteriostatica, mentre coincide, o sovrasta di poco, la MIC per le molecole ad attività battericida. All'interno del progetto di Ricerca Corrente "**Relazione tra consumo di antibiotici e antibiotico-resistenza in indicatori fecali nell'allevamento suino" (IZSLERPRC2019003),** finanziato dal Ministero della Salute, che ha come obiettivo quello di indagare la relazione tra il consumo di antibiotici e l'andamento dei profili di resistenza in *E. coli* indicatori isolati in 10 allevamenti suinicoli, si riportano i risultati preliminari ottenuti valutando i consumi di antibiotico (2020) e le resistenze espresse in *E. coli* indicatori prelevati da suinetti sottoscrofa e suinetti svezzati in tre aziende dell'Emilia Romagna.

MATERIALI E METODI

Consumo di antibiotico

Sono stati raccolti i dati relativi al consumo di antibiotici per l'anno 2020 attraverso la consultazione delle ricette elettroniche (REV), il consumo dell'antibiotico è stato poi

rapportato alla categoria produttiva a cui è stato somministrato secondo le indicazioni degli allevatori e dei veterinari aziendali. La DDDAit di un farmaco veterinario rappresenta la quantità di principio attivo, in milligrammi, somministrata per kg di peso vivo al giorno (mg/kg/d). Le DDDAit sono state stabilite per ciascun principio attivo con attività antimicrobica, contenuto nei farmaci veterinari registrati per il suino in Italia, in modo distinto per ogni via di somministrazione (orale, premiscela, parenterale). Ciascuna DDDAit è stata ricavata calcolando la media aritmetica del dosaggio giornaliero previsto per ogni farmaco e definito nel corrispondente riassunto delle caratteristiche del prodotto (RCP). Le DDDAit dei principi attivi *long acting* sono state ottenute rapportando la dose al numero di giorni corrispondenti all'effetto terapeutico. Infine, sono state assegnate DDDAit specifiche alle associazioni di principi attivi solo nel caso in cui queste fossero legate a un effetto di sinergismo che comportasse una sostanziale riduzione del dosaggio di almeno uno dei due principi attivi associati rispetto a quello dello stesso principio attivo somministrato singolarmente, come previsto dai principi sull'assegnazione delle DDDvet (EMA, 2015). È stato, quindi, calcolato il consumo utilizzando la seguente formula ricavando l'Incidenza del Trattamento» (Treatment Index – TI) per 100 giorni di produzione per ogni categoria produttiva (scrofe, suinetti sottoscrofa, suinetti svezzati, ingrassi):

$$(((mg_pa)/(DDDAit_{pa} * pesovivo_{kg} * n\ animali\ a\ rischio)))/(gg\ a\ rischio_trattamento)) * 100$$

Ad ogni categoria sono stati assegnati i seguenti pesi standard al trattamento: 240 kg per le scrofe, 4 kg per i suinetti sottoscrofa, 12 kg per i suinetti svezzati e 100 kg per gli ingrassi. Il TI100 è una misura standard di calcolo del consumo di antibiotico, che può essere interpretata in tre diversi modi:
1-la percentuale di volte in cui un animale è stato sottoposto ad un trattamento durante il suo ciclo produttivo;
2-il numero di giorni in trattamento per 100 giorni di produzione;
3-il numero di animali trattati per 100 animali presenti nell'allevamento in un dato giorno (AACTING, 2019).

Isolamento di *E. coli* e test di sensibilità

Per ogni allevamento sono stati eseguiti 21 tamponi rettali da suinetti sottoscrofa e 21 da suinetti svezzati privi di sintomatologia gastroenterica. I tamponi rettali sono stati seminati su MacConkey Agar (MAC), selettivo e differenziale per enterobatteri e incubati a 37±2°C in aerobiosi. Colonie tipiche lattosio + sono state isolate su Agar-Sangue (ASA), per identificare il fenotipo emolitico.
Per la determinazione delle MIC tramite piastre commerciali Thermofisher Sensititre™ EUVSEC3 sono state allestite sospensioni e brodi secondo le indicazioni della ditta fornitrice. La sensibilità degli isolati di *E. coli* è stata testata per le molecole elencate in Tabella 1 e utilizzate in ambito europeo per il monitoraggio delle resistenze in batteri zoonotici e commensali isolati da matrici animali all'interno della catena alimentare (suini, bovini, pollame) (Decisione di esecuzione della Commissione Europea (UE) 2020/1729) e interpretati secondo i BP indicati da EFSA (2019).
Dalle MIC ricavate sono state calcolate per ogni molecola la MIC50 (ovvero la concentrazione di antibiotico al di sotto della quale si trovano il 50% dei ceppi isolati) e la MIC90 (ovvero la concentrazione di antibiotico al di sotto della quale si trovano il 90% dei ceppi isolati) per ogni categoria produttiva di ogni singolo allevamento.

Antibiotico	Diluizioni testate (mg/L)	BP clinico	ECOFFs
Ampicillina (AMP)	1; 2; 4; 8; 16; 32	>8	>8
Azitromicina (AZI)	2; 4; 8; 16; 32; 64	ND*	>16
Amikacina (AMI)	4; 8; 16; 32; 64; 128	>16	>8
Gentamicina (GEN)	0.5; 1; 2; 4; 8; 16	>4	>2
Tigeciclina (TGC)	0;25; 0,5; 1; 2; 4;8	>2	>1
Ceftazidime (TAZ)	0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8	>4	>0,5
Cefotaxime (FOT)	0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8	>2	>0,25
Colistina (COL)	1; 2; 4; 8; 16	>2	>2
Acido nalidixico (NAL)	4; 8; 16; 32; 64	ND	>16
Tetracicline (TET)	2; 4; 8; 16; 32	ND	>8
Trimetoprim (TMP)	2; 4; 8; 16; 32; 64	>4	>2
Sulfametoxazolo (SMX)	8; 16; 32; 64; 128; 256; 512	ND	>64
Cloramfenicolo*(CHL)	8; 16; 32; 64	>8	>16
Meropemen (MERO)	0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 16	>0,125	>8
Ciprofloxacina (CIP)	0,015; 0,03; 0,06 0;125; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8	>0,5	>0,06

Tabella 1: Riepilogo delle molecole antibiotiche testate, loro diluizioni BP clinici e ECOFF per la determinazione delle resistenze dei ceppi (EFSA, 2019)*ND: non disponibile.
Table 1: Summary of tested antibiotic molecules, their clinical BP dilutions and ECOFF for the determination of strain resistances (EFSA, 2019)*ND: not available.

Per alcune molecole (AMP, AZI, AMI, GEN, COL, NAL, TET, TMP, SMX, CHL e CIP), quando possibile, è stata determinata anche la MBC seminando, per ogni pozzetto privo di crescita, 20µl di brodo su piastra con terreno non selettivo Plate Count Agar (PCA). Dopo incubazione delle piastre a 35°C per 24h, sono state registrate le crescite relative alle diverse diluizioni per ogni molecola. Dalle MBC ricavate, sono state calcolate la MBC50 e la MBC90 di ogni antibiotico per ogni categoria produttiva di ciascun allevamento.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Allevamenti testati e consumo di antibiotico:
I tre allevamenti testati (A, B, C) risultano così composti:
- A: allevamento con settore di riproduzione e post-svezzamento, consistenza media di 150 scrofe;
- B: allevamento a ciclo chiuso composto da riproduzione, post-svezzamento e ingrasso, consistenza media di 150 scrofe;
- C: allevamento con settore di riproduzione e post-svezzamento, consistenza media di 220 scrofe.

In Figura 1 è riportato il dato di consumo dell'antibiotico nell'anno 2020 (TI), declinato come numero di giorni di trattamento per 100 giorni di produzione.
Tra le categorie produttive allevate, quella più trattata con antibiotici è stata sicuramente quella degli svezzati, in particolare il consumo di farmaco si è attestato su livelli alti nell'allevamento A (TI=197) e medio-alto nell'allevamento B (TI=144), mentre nell'allevamento C si è fermato su valori medio-bassi (TI=54). Nei suinetti sottoscrofa il consumo di antibiotico complessivo è risultato simile per i tre allevamenti (rispettivamente TI= 30,8, 31,6; 22,5), ma si registra un consumo inferiore nelle scrofe nell'azienda A (TI<1) rispetto a B (TI=17,5) e C(TI=20,1).

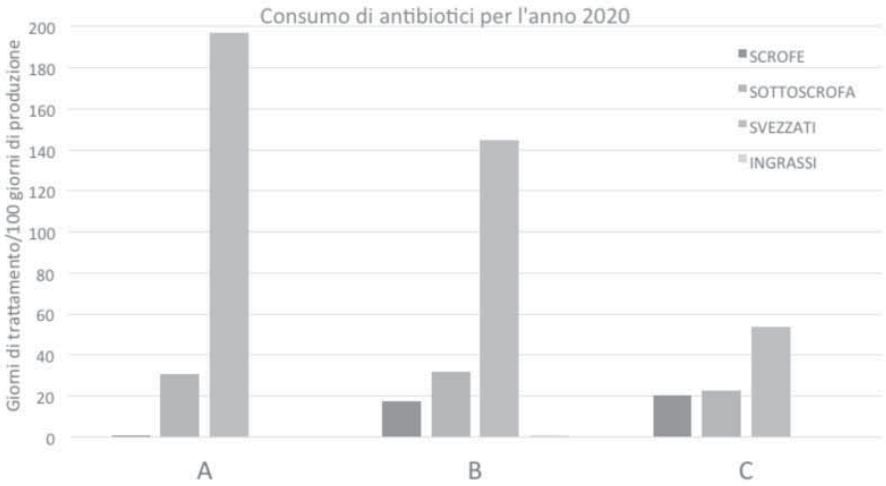


Figura 1: Consumo totale di antibiotico per l'anno 2020 suddiviso per azienda e categorie produttive.
Figure 1: Total antibiotic consumption (2020) divided by farm for sows, piglets, weaners and fatteners.

Considerando i consumi delle diverse classi di antibiotico, le molecole più utilizzate in tutte e tre le aziende sono state le aminopenicilline sia nei suinetti svezzati (Figura 2), sia nei suinetti sottoscrofa (Figura 3) (TI_B=135, TI_C=83, TI_A=32). L'allevamento A, tra le tre aziende, è stato l'unico ad utilizzare negli svezzati le pleuromutiline (TI=46), le tetracicline (TI=32) e i macrolidi (TI=27), ed in misura minore fluorochinoloni (TI=6), lincosamidi (TI=1) e penicilline (TI<1). Altre molecole utilizzate da tutti e 3 gli allevamenti sono state gli amfenicoli e gli aminoglicosidi (in particolare l'azienda C con TI=20 ed in misura minore l'azienda B con TI=7 e l'azienda A con TI=1).

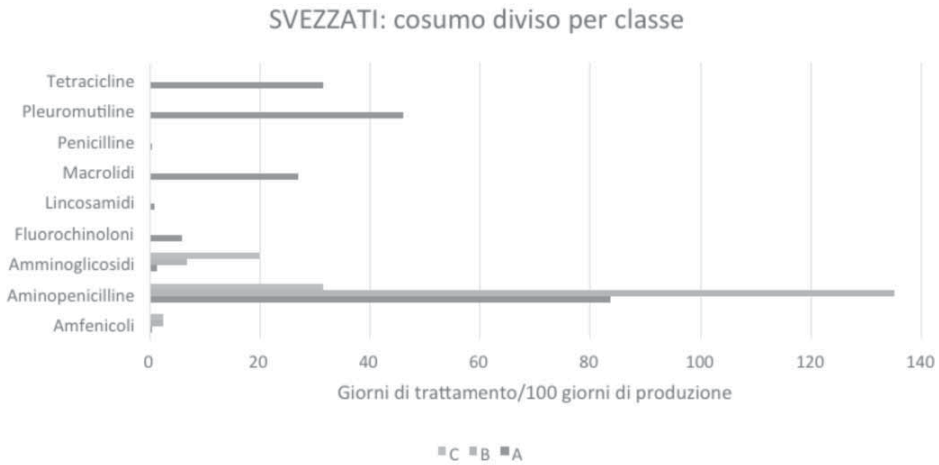


Figura 2: Consumo di antibiotico suddiviso per molecole ed azienda nella categoria degli svezzati.
Figure 2: Antibiotic consumption divided by molecule and farm in weaners.

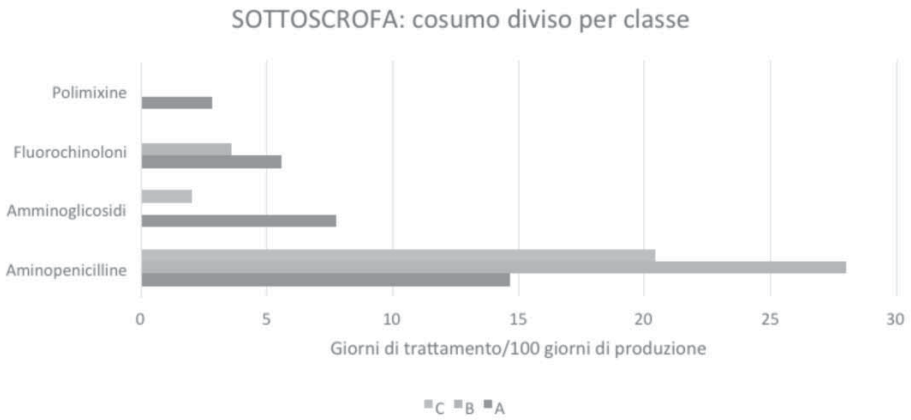


Figura 3: Consumo di antibiotico suddiviso per molecole ed azienda nella categoria dei sottoscrofa.
Figure 3: Consumption of antibiotic divided by molecule and farm in piglets.

Nei suinetti sottoscrofa (Figura 3) le molecole più utilizzate in tutte e tre le aziende sono risultate le aminopenicilline, seppur con consumi molto ridotto rispetto agli svezzati (TI_B=28, TI_C=20, TI_A=15). L'allevamento A, inoltre, ha consumato fluorochinoloni insieme all'allevamento B (TI_A=6 e TI_B=4), aminoglicosidi insieme all'allevamento C (TI_A=8 e TI_C=2) e polimixine (TI=3).
Il consumo di HPCIAs nei tre allevamenti per ognuna delle categorie produttive viene riportato in Figura 4. L'azienda A è l'unica ad utilizzare HPCIAs nella categoria degli svezzati. Chinoloni e Fluorochinoloni risultano essere le molecole di importanza critica maggiormente utilizzate in tutti e 3 gli allevamenti ed in tutte le categorie produttive, in particolare: per i sottoscrofa sono usati nell'azienda A (TI=6) e nell'azienda B (TI=4), mentre risultano consumati per le scrofe nell'azienda B (TI=7) e nell'azienda C (TI=4). L'allevamento A è stato l'unico a fare ricorso anche alla Colistina (TI=3), in particolare nei sottoscrofa. Non sono riportati consumi di cefalosporine di III e IV generazione.

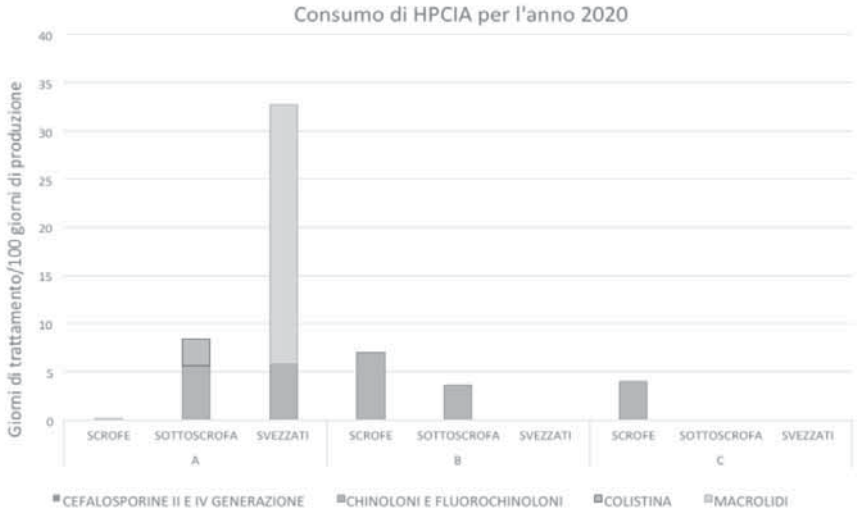


Figura 4: Consumo di HPCIAs suddiviso per molecola, azienda e categoria produttiva.
Figure 4: HPCIAs consumption divided by molecule and farm for sows, piglets and weaners.

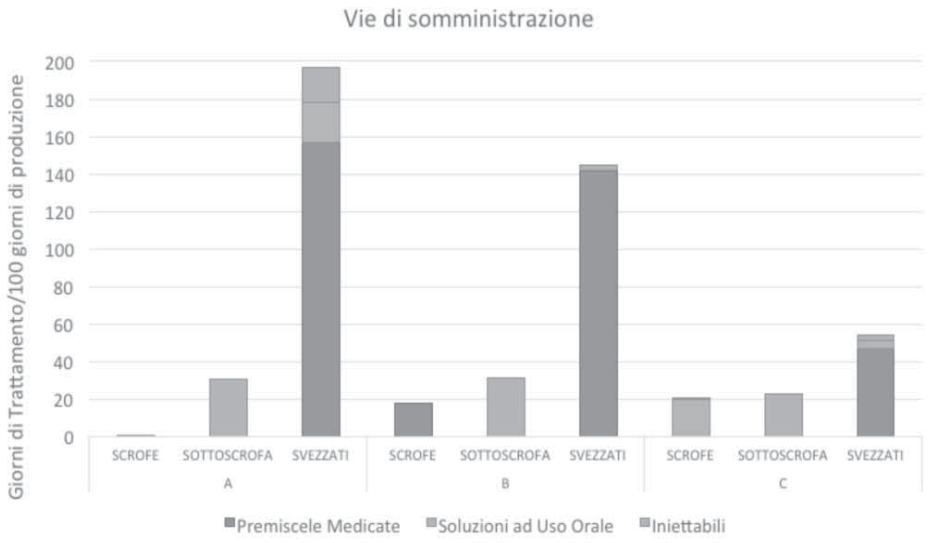


Figura 5: Vie di somministrazione di antibiotico suddivise per azienda e categoria produttiva.
Figure 5: Route of antibiotic administration by farm for sows, piglets and weaners.

Infine, riguardo le vie di somministrazione dell'antibiotico, risulta evidente come per tutte le tre aziende la via orale tramite la somministrazione di premiscele medicate sia quella prevalente nella categoria degli svezzati, al contrario nei suinetti sottoscrofa l'antibiotico è stato somministrato esclusivamente per via iniettiva. Nelle scrofe, invece, si manifestano tre differenti situazioni, l'azienda A ha utilizzato maggiormente la via iniettiva, la B la via orale tramite premiscele e la C la via orale tramite soluzioni da sciogliere in acqua (Figura 5).

Sensibilità agli antibiotici
Complessivamente sono stati isolati e testati in brododiluizione:

- A: 21 *E. coli* (0 emolitici) da sottoscrofa; 20 *E. coli* (2 emolitici) da suinetti svezzati
- B: 21 *E. coli* (3 emolitici) da sottoscrofa; 21 *E. coli* (6 emolitici) da suinetti svezzati
- C: 21 E coli (1 emolitico) da sottoscrofa; 18 *E. coli* (2 emolitici) da suinetti svezzati

Le MIC 90 e le MBC 90 calcolate per ciascuna molecola testata sono riportate rispettivamente in Tabella 2 e Tabella 3.

Il maggior consumo di antibiotico si è verificato nella categoria degli svezzati per tutte le aziende, tramite l'utilizzo di premiscele medicate. Rispetto agli svezzati, il consumo di antibiotico cala sensibilmente nelle categorie dei sottoscrofa, dove viene preferita la via iniettiva, e nelle scrofe, dove la via di somministrazione è risultata eterogenea.
L'ampio ricorso ad una specifica classe di molecole, le aminopenicilline, è risultato analogo all'interno delle tre aziende in tutte le categorie produttive, ad eccezione delle scrofe presenti nelle aziende A e B. L'elevato ricorso alle aminopenicilline può essere la causa dei valori elevati di MIC50 e MIC90 registrati per questa molecola sia nei suinetti sottoscrofa, sia negli svezzati (Tabella 3), con valori ben oltre il BP clinico (>8). La resistenza alle

aminopenicilline degli *E. coli* è stata riportata anche dallo studio di Bosco *et al*. (2021), condotto su *E. coli* isolati da matrici patologiche di suino in 4 anni (2017-2021) nelle sedi IZSLER dell'Emilia-Romagna, in cui si è osservata resistenza ad AMP nel 95,9% dei ceppi isolati. In contesto europeo, su *E. coli* commensali isolati da campioni fecali e carni fresche di suini da ingrasso, sono stati registrati livelli variabili di resistenza ad AMP, con una media del 32%, in ceppi di *E. coli* isolati in 31 Paesi (28 UE e 3 extra UE), in particolare i livelli più alti di resistenze sono stati rilevati in Spagna (77,1%) e Italia (70,6%), mentre quelli più bassi in Norvegia (6,9%) e Finlandia (8,6%) (EFSA, 2020). In quest'ultima pubblicazione, però, gli isolati provenivano esclusivamente da ingrassi, dove i consumi di antibiotico sono generalmente molto ridotti rispetto alle categorie produttive prese in considerazione nel presente progetto.
Dopo l'AMP, tra molecole testate verso le quali si sono registrate maggiori resistenze, compaiono la TET, il SMX e il TMP, per le quali le MIC90 e le MBC90 (Tabelle 3 e 4) hanno superato la massima diluizione testata all'interno del panel in tutte e tre le aziende sia negli svezzati che per i sottoscrofa, con livelli ben oltre i BP clinici o gli ECOFFs. A differenza delle aminopenicilline, però, analizzando i dati sulle resistenze con i dati sui consumi delle singole molecole, non sembra che via sia un nesso di causalità; infatti, è stato registrato solo utilizzo di TMP per gli svezzati dell'allevamento A. Anche Bosco *et al*. (2021) ha evidenziato alti livelli di resistenza medi nel quadriennio 2017-2021 per TET (89,7%) e SMX (74,8%). Nel report EFSA (2020) sono stati riportati livelli di resistenza in *E. coli* a TET, TMP e SMX considerevoli, con intervalli ampi a seconda dello Stato considerato, inoltre, si è osservata una MDR (*Multi Drug Resistance*) per AMP, TET, TMP, SMX nel 48,5% degli isolati di *E. coli*. Queste resistenze risultano di fatto in linea con i rapporti EMA (2020) sulla vendita dei prodotti antibiotici ad uso veterinario in Europa dal 2011 al 2018, nei quali appare evidente come i principi attivi maggiormente utilizzati in medicina veterinaria appartengano alle classi di tetracicline, penicilline e sulfamidici (Bosco *et al.*, 2021). L'acquisizione di resistenze da parte dei batteri, però, non è sempre limitata al solo meccanismo d'azione della molecola antibiotica utilizzata, si parla infatti di "resistenza pleiotropica" quando un singolo evento genetico, come una mutazione o acquisizione di geni di resistenza, produce effetti su diverse classi antimicrobiche (Cantón *et al.,* 2011). Un esempio è la mutazione che provoca una *up-regulation* delle pompe di efflusso di *Pseudomonas aeruginosa*, a cui consegue contemporaneamente resistenza nei confronti di composti beta-lattamici, fluorochinoloni e aminoglicosidi. Inoltre, non sempre l'acquisizione di geni di resistenza ha ripercussioni negative sulla *fitness* del battere, può succedere quindi che, una volta acquisiti geni di resistenza, questi permangano nella popolazione batterica anche in assenza di selezione esercitata dall'antibiotico (Cantón *et al.,* 2011), diventa interessante, quindi, valutare anche lo storico dei consumi di antibiotico dell'allevamento.

	AMP			AZI			AMI			GEN			TGC			TAZ			FOT			COL			NAL			TET			TMP			SMX			CHL			MERO			CIP		
	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90	TOT	MIC 50	MIC 90
A sottoscr	21	> 32	> 32	21	8	64	21	4	4	21	> 16	> 16	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	1	1	21	> 64	>64	21	> 32	> 32	21	> 16	> 16	21	> 512	> 512	21	> 64	> 64	21	0,03	0,03	21	8	>8
A svezzati	20	> 32	> 32	20	4	8	20	4	4	20	0,5	8	20	0,25	0,25	20	0,25	0,25	20	0,25	0,25	20	1	1	20	4	8	20	> 32	> 32	20	0,25	> 16	20	> 512	> 512	20	8	> 64	20	0,03	0,03	20	0,015	0,25
B sottoscr	21	> 32	> 32	21	4	64	21	4	4	20	0,5	0,5	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	1	1	21	4	> 64	21	2	> 32	21	> 16	> 16	21	> 512	> 512	21	8	16	21	0,03	0,03	21	0,015	0,5
B svezzati	21	> 32	> 32	21	4	8	21	4	4	21	8	> 16	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	1	1	21	8	>64	21	> 32	> 32	21	> 16	> 16	21	> 512	> 512	21	> 64	> 64	21	0,03	0,03	21	0,06	0,25
C sottoscr	21	> 32	> 32	21	4	8	21	4	4	21	0,5	16	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	0,25	0,25	21	1	1	21	4	> 64	21	32	> 32	21	> 16	> 16	21	32	> 512	21	8	>64	21	0,03	0,03	21	0,015	1
C svezzati	18	> 32	> 32	18	8	32	18	4	4	18	> 16	>16	18	0,25	0,25	18	0,25	0,50	18	0,25	0,25	18	1	1	18	4	> 64	18	> 32	> 32	18	> 16	> 16	18	> 512	> 512	18	>64	>64	18	0,03	0,03	18	0,015	2

Tabella 2: MIC50 e MIC90 dei ceppi isolati suddivisi per allevamento, categoria produttiva ed antibiotico.
Table 2: MIC50 and MIC90 of the isolated strains divided by farm and antibiotic for piglets and weaners.

	AMP			AZI			AMI			GEN			NAL			TET			TMP			SMX			CHL			CIP		
	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90	TOT	MBC 50	MBC 90
A sottoscr	21	> 32	> 32	20	32	64	21	4	16	20	>16	>16	21	>64	>64	21	>32	>32	20	>16	>16	19	>512	>512	19	>64	>64	19	>8	>8
A svezzati	20	> 32	> 32	19	8	8	20	4	4	19	0,5	8	19	4	32	20	>32	>32	20	2	>16	20	>512	>512	20	>32	>64	17	0,015	>8
B sottoscr	21	> 32	> 32	20	8	64	20	4	4	21	0,5	0,5	20	4	>64	20	>8	>32	21	>16	>16	21	>512	>512	20	>32	>64	19	0,03	0,5
B svezzati	21	> 32	> 32	19	8	>16	20	4	>16	21	8	>16	20	8	>64	21	>32	>32	21	>16	>16	21	>512	>512	21	>64	>64	17	0,06	0,5
C sottoscr	21	> 32	> 32	20	4	>32	21	4	4	21	0,5	16	20	4	>64	21	>32	>32	19	>16	>16	19	>64	>512	21	32	>64	21	0,03	>2
C svezzati	18	> 32	> 32	15	8	64	18	4	4	16	>16	>16	16	4	>64	17	>32	>32	18	>16	>16	18	>512	>512	17	>64	>64	16	0,03	2

Tabella 3: MBC50 e MBC90 dei ceppi isolati suddivisi per allevamento, categoria produttiva ed antibiotico.
Table 3: MBC50 and MBC90 of the isolated strains divided by farm and antibiotic for piglets and weaners.

Interessante è quanto emerso per la gentamicina (GEN): questa molecola, appartenente alla classe degli aminoglicosidi, è stata utilizzata nei sottoscrofa degli allevamenti A e C e negli svezzati degli allevamenti B e C (Figura 2, Figura 3). Similmente, i valori di MIC90 e MBC90 sono risultati molto elevati nelle stesse categorie (Figura 6). Nello studio di Bosco *et al*. (2021) erano state individuate resistenze a GEN in *E. coli* da matrici patologiche fino a percentuali massime del 63,3%. Dal report EFSA sono stati ottenuti livelli di resistenza alla GEN da bassi a molti bassi (media europea 2,7%), benché singoli Stati abbiano riscontrato valori più elevati della media, in particolare Italia e Grecia (9,4%) (EFSA,2020).
Per un altro aminoglicoside testato (AMI), i valori ottenuti hanno mostrato MIC90 tutte inferiori al BP clinico (>16) in tutte le aziende per tutte le categorie produttive, ma nei sottoscrofa dell'allevamento A e negli svezzati dell'allevamento B la MBC90 è risultata maggiore (rispettivamente 16 e >16) (Figura 7), contrariamente a ciò che ci si dovrebbe attendere per le molecole che svolgono un meccanismo d'azione battericida in cui MIC e MCB dovrebbero coincidere (Nameth *et al.*, 2014). Nell'allevamento A il consumo di aminoglicosidi nei sottoscrofa è piuttosto elevato, quindi, questo dato è in linea con quanto osservato, nell'allevamento B, invece, il consumo negli svezzati non si trova tra i più elevati, ma non abbiamo informazioni in merito ai consumi relativi agli anni precedenti il 2020.

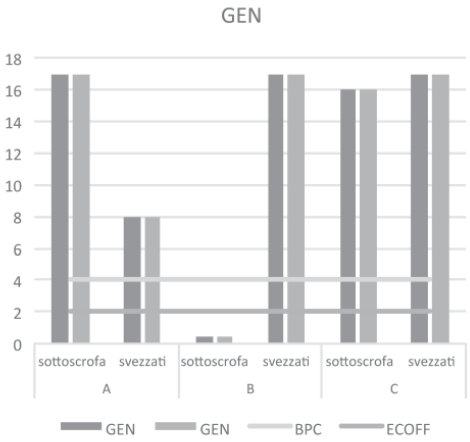


Figura 6: Valori di MIC90 e MBC90 per GEN in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 6: MIC90 and MBC90 for GEN in indicator *E. coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

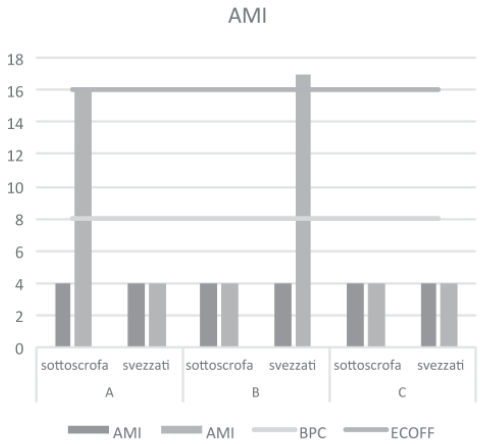


Figura 7: Valori di MIC90 e MBC90 per AMI in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 7: MIC90 and MBC90 for AMI in indicator *E. coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Riguardo al CHL, appartenente alla classe dei fenicoli, le MIC90 sono risultate tutte oltre l'ultima diluizione testata (>64) in sottoscrofa e svezzati di tutte e tre le aziende, ad eccezione dei sottoscrofa dell'azienda B (MIC90=16), con MIC 90 inferiore ma comunque oltre il BP clinico (>8) (Figura 8). A livello europeo le resistenze di *E. coli* isolati dal suino a CHL sono risultate a livelli medi o moderati (12% dei ceppi analizzati resistenti), benché alcune nazioni abbiano fatto registrare livelli maggiori (Italia 47,6%, Portogallo 44,4%, Grecia 40,6%, Cipro 54,4%) (EFSA,2020). Ricordiamo che il Cloramfenicolo (CHL) è vietato negli animali produttori di derrate alimentari dal 1994, tuttavia viene utilizzato come molecola prototipo rilevatore di resistenze per il Tiamfenicolo e in parte per il Florfenicolo (FFC), il cui uso è ammesso per questa categoria di animali (Poirel *et al. 2018*). In un microrganismo la resistenza al FFC si estende anche al CHL, mentre altri meccanismi di resistenza al CHL non estendono la resistenza verso il FFC (https://www.izslt.it/crab/pillole-per-il-veterinario-pratico/).

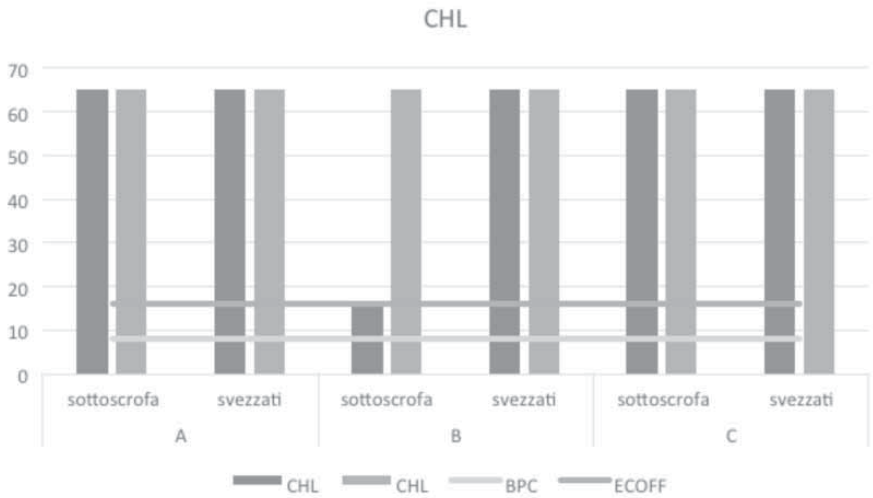


Figura 8: Valori di MIC90 e MBC90 per CHL in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 8: MIC90 and MBC90 for CHL in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Sensibilità ai HPCIAs
Per quanto riguarda chinoloni (NAL) e fluorochinoloni (CIP): le MIC90 e le MBC90 per NAL sono risultate tutte oltre il limite dell'ultima diluizione (>64) nei tre allevamenti nelle diverse categorie produttive, tranne per gli svezzati dell'azienda A (Figura 9); le MIC90 per CIP sono risultate oltre il BP clinico (>0,5) nei sottoscrofa e negli svezzati dell'allevamento C e oltre l'ultima diluizione disponibile nei sottoscrofa di A (Figura 10).

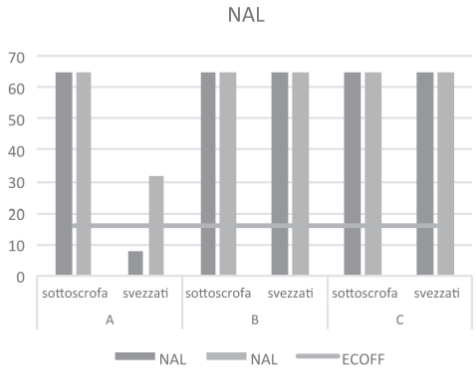


Figura 9: Valori di MIC90 e MBC90 per CHL in *E. coli* indicatori rapportati all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 9: MIC90 and MBC90 for NAL in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

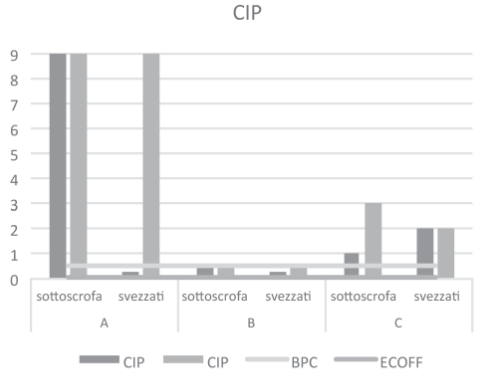


Figura 10: Valori di MIC90 e MBC90 per CIP in *E. coli* indicatori rapportati al BPC (Break Point Clinico) e all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 10: MIC90 and MBC90 for CIP in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Come si evince dalla Figura 4, il consumo di chinoloni e fluorochinoloni si è registrato in sottoscrofa e svezzati dell'azienda A, nelle scrofe dell'allevamento B e C e nei sottoscrofa dell'allevamento B. In particolare, l'azienda A ha avuto consumi di fluorochinoloni (CIP) da moderati ad elevati in tutti e tre gli indirizzi produttivi, infatti nonostante calino sia il consumo sia la MIC90 negli svezzati rispetto ai sottoscrofa, la MBC90 negli svezzati rimane elevata al pari della MBC90 nei sottoscrofa, riflesso di una possibile perdita di efficacia della molecola per raggiungere la concentrazione battericida. I valori MIC90 e MBC90 per NAL (chinoloni) in B e C risultano elevati e, nonostante non vi sia stato consumo di chinoloni in sottoscrofa e svezzati, si è registrato un consumo elevato nelle scrofe. Si noti anche che i consumi di fluorochinoloni siano, tra le tre aziende, più bassi nell'allevamento C, quindi è probabile che i valori MIC90 e MBC90 oltre i *break point* in questo allevamento possano essere ascrivibili a resistenze pleiotropiche o resistenze selezionate dall'uso di queste classi di molecole negli anni passati, oppure influenzati dai consumi registrati nelle scrofe (Figura 4). Contrariamente ai dati registrati in questi allevamenti, la percentuale media di *E. coli* resistenti alla CIP è risultata leggermente più elevata (7,4%) rispetto al NAL (6,2%) considerando il contesto europeo dei suini da ingrasso (EFSA, 2020).
L'unico allevamento che ha fatto ricorso alla classe dei macrolidi è stato A per gli svezzati, dove però la MIC90 e la MBC90 sono risultate le più basse (8), e al di sotto del ECOFF (>16) (Figura 13). Le MIC90 sono risultate oltre gli ECOFFs negli svezzati di C (32) ed oltre l'ultima diluizione disponibile (>64) nei sottoscrofa di A e B. L'AZI, come gli altri macrolidi, è considerato un antibiotico batteriostatico, tuttavia ad alte dosi il suo meccanismo d'azione diviene battericida (HUMANITAS, 2021); per questo motivo, il fatto che la dose battericida sui ceppi commensali esaminati, in particolare negli svezzati dell'azienda B ed in entrambe le

categorie di C, risulti più elevata rispetto alla dose batteriostatica (MBC90>MIC90) appare in linea con le caratteristiche del farmaco. L'azienda B, come descritto in Figura 4, è stata l'unica ad utilizzare lincosamidi nelle scrofe: quest'evento potrebbe aver favorito l'insorgenza di resistenze ad AZI nei sottoscrofa di B, vista l'affinità del meccanismo d'azione sulla subunità 50s ribosomiale tra lincosamidi e macrolidi ed il similare meccanismo di resistenza adottato dai batteri verso entrambe le molecole (Docquier, 2012). I valori di MIC90 dell'AZI oltre l'ECOFF nei sottoscrofa di A e negli svezzati di C, invece, non trovano un nesso causale nei consumi stimati in questi indirizzi produttivi, quindi è possibile che siano l'effetto di un consumo antecedente al 2020 o di resistenze pleiotropiche. A livello europeo le resistenze all'AZI registrate in *E. coli* indicatori isolati da suini sono risultate rare o comunque a livelli bassi o molto bassi (media europea 1,5%) (EFSA, 2020).

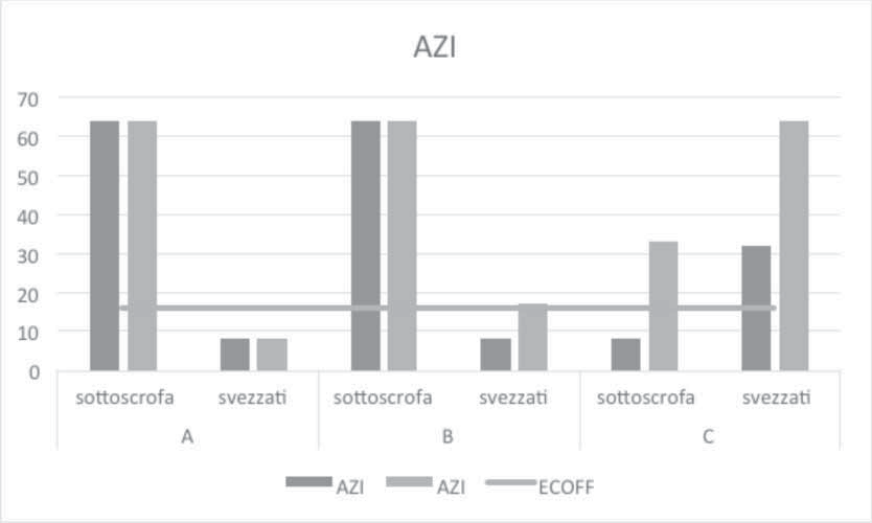


Figura 11: Valori di MIC90 e MBC90 per AZI in *E. coli* indicatori all'ECOFF (break point epidemiologico), suddivisi per allevamento e categoria produttiva.
Figure 11: MIC90 and MBC90 for AZI in indicator *E.coli* related to CBP (Clinical Break Points) and ECOFF (Epidemiological Break Points), divided by farm in piglets and weaners.

Per quanto riguarda le altre classi di HPCIAs, cefalosporine di III e IV generazione (FOT, TAZ) e polimixine (COL), non sono state registrate MIC90 superiori ai BP clinici, benché l'allevamento A abbia fatto uso di COL nei sottoscrofa. Nello studio di Bassi *et al.* (2021) è stato riportato un calo del consumo di COL nei sottoscrofa del 98,7% nel triennio 2016-2018, imputabile prevalentemente alla revoca all'autorizzazione all'immissione in commercio di prodotti contenenti associazioni con colistina da somministrare per via orale (Decisione di Esecuzione della Commissione del 14.7.2016), mentre è risultato nullo nelle scrofe e negli svezzati, in un campione di allevamenti in Emilia-Romagna. A livello europeo le resistenze riscontrate in queste classi di molecole sono state rare o molto basse (EFSA,2020). Non si sono registrate resistenze ai carbapenemi (MERO) negli isolati testati.

CONCLUSIONI

Dai risultati preliminari ottenuti, è emerso che l'elevato grado di resistenze riscontrate per aminopenicilline è in accordo con i consumi di queste molecole nell'allevamento, così come sembra esserci un discreto grado di concordanza tra consumi e resistenze per Gentamicina;

invece, altre molecole quali SMX, TET, TMP, CHL hanno registrato MIC90 e MBC90 elevate, pur non registrando un consumo sempre elevato della molecola nelle stesse categorie produttive. Sono state individuate, inoltre, resistenze, anche multiple, ad alcuni HPCIAs delle classi di chinoloni, fluorochinoloni e macrolidi. Questi dati, seppur preliminari, inducono a porre l'attenzione a meccanismi di multi-resistenza come la cross-resistenza o resistenza pleiotropica, attraverso i quali si selezionano resistenze anche differenti rispetto alle molecole di più diffuso utilizzo, grazie alla complessità dei meccanismi che si insinuano nel processo di selezione, rendendo ancora più importante l'attività di riduzione complessiva e ottimizzazione del consumo di antibiotico. Come previsto dal progetto, l'andamento dei consumi e delle resistenze sarà monitorato nel tempo e ulteriori indagini di tipo molecolare permetteranno di indagare i genotipi di resistenza riscontrati e l'eventuale significato in relazione ai consumi di antibiotico registrati.

BIBLIOGRAFIA

1. AACTING (2019): "Guidelines for collection, analysis and reporting of farm-level antimicrobial use, in the scope of antimicrobial stewardship" - https://aacting.org/swfiles/files/AACTING_Guidelines_V1.2_2019.07.02_54
2. Bassi P., Trevisi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Rugna G., Motta V., Diegoli G.,
3. Merialdi G (2021): "Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia-Romagna nel triennio 2016-2018" – Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini – XLVI Meeting Annuale, Pescantina (VR), 9-10 settembre 2021, 243-249.
4. Bosco C., Bonilauri P., Rugna G., Luppi A., Fontana M.C., Fiorentini L., Bassi P (2021): "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" – Atti della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini – XLVI Meeting Annuale, Pescantina (VR), 9-10 settembre 2021, 121-131.
5. Cantón R & Ruiz-Garbajosa P (2011): "Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes"; COPHAR, 11:477-485.
6. Diegoli G, Granito G, Luppi A, Masera F, Merialdi G, Miraglia V, Mussini P, Trevisi P, Trambajolo G, (2018): "Linee guida Uso prudente degli antibiotici nell'allevamento suino", Regione Emilia Romagna, https://www.alimenti-salute.it/sicurezza-alimentare/linee-guida-sulluso-prudente- antibiotici
7. Docquier J D (2013): "Gli agenti antibatterici: Meccanismo di azione, sviluppo ed applicazioni cliniche, meccanismi di resistenza"-
8. https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/27-06-2013/iv-farmacia-antibiotic_resistance_2013
9. EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2019):" Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food"- https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5709
10. EFSA - European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (2020): "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2018/2019"- https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2903/j.efsa.2021.6490
11. EMA - European Medicines Agency (2015) "Principles on Assignment of Defined Daily Dose for Animals (DDDvet) and Defined Course Dose for Animals (DCDvet)" (EMA/710019/2014).

12. Nemeth J, Oesch G, Kuster S P (2014): “Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious”. J Antimicrob Chemother 2015; 70: 382–395.
13. Poirel L, Madec J Y, Lupo A, Schink A K, Kieffer N, Nordmann P, Schwarz S (2018): “Antimicrobical Resistance in Escherichia coli”. ASM Journals - Microbiology Spectrum - Vol. 6, No. 4
14. Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico-Resistenza 2017-2020. Allegato al parere della Sezione III del Consiglio Superiore di Sanità del 21 luglio 2017.
15. Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G. e Clementi M. (2002): “Microbiologia medica”. UTET, Torino, pp. 731-732.
16. Silley P. (2012): “Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean?”, Rev. - Off. Int. Epizoot. , 31 (1): 33-41.
17. UE (2016): DECISIONE DI ESECUZIONE DELLA COMMISSIONE del 14.7.2016 relativa, nel quadro dell’articolo 35 della direttiva 2001/82/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, all’autorizzazione all’immissione in commercio di tutti i medicinali veterinari contenenti “colistina” in associazione con altri agenti antimicrobici per somministrazione orale.
18. UE (2020): Decisione di esecuzione (UE) 2020/1729 della Commissione del 17 novembre 2020 relativa al monitoraggio e alle relazioni riguardanti la resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali, che abroga la decisione di esecuzione 2013/652/UE
19. World Health Organization (2018): “Critically important antimicrobials for human medicine”, 6th revision, Geneve (CH), ISBN 978-92-4-151552-8.

SITOGRAFIA:

- https://www.izslt.it/crab/pillole-per-il-veterinario-pratico/
- www.clsi.org
- www.ema.europa.eu/en/documents/report/infographic-categorisation-antibiotics-use-animals-prudent-responsible-use_en.pdf
- www.eucast.org

PRINCIPALI CAUSE DI MORTE NEGLI ALLEVAMENTI SUINI DEL PIEMONTE: INDAGINI ANATOMO-ISTOLOGICHE E MICROBIOLOGICHE

MAIN CAUSES OF DEATH IN PIG FARMS IN PIEDMONT: ANATOMO-HISTOPATHOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL INVESTIGATIONS

CUCCO I.[1], COLOMBINO E.[1], PEROTTI M.[1], ZOPPI S.[2], ALBORALI G.L.[3], BONVEGNA M.[1], CARUSO C.[4], GORIA M.[2], MANDOLA L.[2], MANNELLI A.[1], MIOLETTI S.[1], SALOGNI C.[3], SONA B.[5], SPARASCI ORIANA A.[2], TARANTOLA M.[1], TOMASSONE L.[1], TONNI M.[3], TURSI M.[1], VERCELLI C.[1], ZOCCOLA R.[2], DONDO A.[2], CAPUCCHIO MARIA T.[1]

[1]Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco
[2]Istituto Zooprofilattico del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino
[3]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) "Bruno Ubertini", Brescia;
[4]ASL CN1 - Sanità Animale, distretto di Racconigi, Cuneo;
[5]ASL CN1 - Sanità Animale, distretto di Villafalletto, Cuneo.

Parole chiave: suino, cause di morte, virus, batteri, indagini anatomo-patologiche, microbiologia, istologia
Keywords: swine, causes of death, viruses, microorganisms, anatomo-histopathological investigation, microbiology, histology

RIASSUNTO
Negli allevamenti suini, le malattie infettive e non infettive impattano negativamente sulla salute degli animali e sulla produttività aziendale. Lo scopo di questo studio è indagare le cause di morte più comuni nei suini in post-svezzamento (PS) e ingrasso (I) in 5 allevamenti piemontesi a ciclo chiuso. Un totale di 192 suini sono stati sottoposti ad esame necroscopico e classificati come casi respiratori (CR), enterici (CE) o sistemici (CS) in base al quadro anatomo-patologico osservato. A seconda della classificazione sono stati campionati determinati organi per le analisi microbiologiche e istologiche. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software R. Le patologie infettive sono state registrate come la principale causa di morte in entrambe le categorie (93.7% PS; 85.7% I). Le criticità dello svezzamento hanno determinato mortalità più elevate nei PS, caratterizzate soprattutto da CS (56.7%), mentre negli ingrassi la prevalenza dei CR (57.1%) riflette le criticità gestionali di questa fase. Indipendentemente dalla categoria di peso, tra i CS e i CR, i patogeni più frequentemente riscontrati sono stati *Streptococcus spp*. ed *E. coli*. Tra gli agenti virali, soprattutto il virus della sindrome riproduttiva e respiratoria del suino e il circovirus porcino di tipo 2 circolavano negli allevamenti analizzati. Nei CE, *E. coli, Brachyspira spp* e *Salmonella* Typhimurium variante monofasica 4,[5],12:i:- sono stati gli isolamenti più comuni in entrambe le categorie. Le principali cause di morte non infettiva sono state le ernie ombelicali (33.3% nei PS e 42,9% negli I). Ulteriori studi sono necessari per indagare l'antibioticoresistenza dei ceppi batterici isolati e valutare l'uso del farmaco e la biosicurezza in allevamento.

ABSTRACT
Pig farms can suffer from a wide range of infectious diseases with a detrimental effect on health and productivity. Aim of the study was to evaluate the main causes of death and main

circulating pathogens in post-weaning (PW) and fattening (F) pigs of five farms in north-west Italy. A total of 192 pigs were necropsied and classified as respiratory (RC), enteric (EC) or systemic cases (SC) based on the main gross findings. Different organs were collected for microbiological and histopathological investigations. Statistical analysis was performed using R software. In both category death was mainly attributed to viral and bacterial pathogens (93.7% PW; 85.7% F). The higher mortality recorded in PS could be related to the weaning criticism, having 56.7% of SC, while in the fattening period the higher incidence of RC (57.1%) could be due to the high animal density and consequent ventilation problems. Regardless of the weight category, *Streptococcus spp*. and E. coli were the most frequent pathogens in SC and RC. Among viral agents, the swine reproductive and respiratory syndrome and the porcine circovirus 2 were mainly recorded. In the EC group, *E. coli, Brachyspira spp* and new monofasic variant of *S. typhimurium* were isolated. The main not infective causes of death were umbilical hernias (33.3% PS and 42,9% I). Further analysis are required for investigating the antibiotic resistance in the obtained bacterial isolations, and evaluating the antimicrobial correct use and biosecurity in pig farms.

INTRODUZIONE

Nei Paesi industrializzati si è assistito alla progressiva intensificazione delle aziende suinicole e alla nascita dei sistemi multi – sito, caratterizzati dalla differenziazione della fase di riproduzione, svezzamento e ingrasso (Harris, 2000). I cambiamenti gestionali, la maggiore densità di animali per allevamento, la globalizzazione e le movimentazioni di animali e carne suina, associati a misure di biosicurezza inadeguate, hanno favorito la diffusione delle malattie infettive (Drew, 2011). Le patologie di origine virale e batterica costituiscono, infatti, uno dei principali fattori che limita la produzione, impattando negativamente sulla salute degli animali e sulla produttività aziendale. In particolare, i principali agenti infettivi responsabili di elevati indici di morbilità e mortalità nell'allevamento suino sono la sindrome riproduttiva e respiratoria del suino (PRRS), il circovirus porcino di tipo 2 (PCV2) l'influenza suina tra i virus e *Streptococcus suis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Brachispira spp.*, *Lawsonia intracellularis*, *Glaesserella parasuis* tra i batteri. Alcuni di questi agenti patogeni posso essere responsabili del complesso delle malattie respiratorie del suino, una sindrome di natura multifattoriale che colpisce duramente la fase di accrescimento e ingrasso (Kim et al., 2003). Non meno importanti sono le patologie non infettive come ernie ombelicali e inguinali, ulcere e torsioni gastriche, ostruzioni intestinali e prolassi rettali e vaginali (Thomson e Friendship, 2019).

Per migliorare la produttività negli allevamenti è necessario, quindi, individuare le patologie infettive più comuni, ma anche quelle di origine nutrizionale, genetica e gestionale, che costituiscono ancora un limite per la salute e la produttività aziendale (Davies, 2012). La prevenzione delle malattie infettive è fondamentale anche nella riduzione dell'uso di farmaci antibiotici nella produzione suinicola, identificata come uno dei settori zootecnici più problematici per quanto riguarda il consumo di antimicrobici (Postma et al., 2016).

In particolare, lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare le principali cause di morte e gli agenti patogeni più frequenti in cinque allevamenti piemontesi mediante analisi anatomo–istopatologiche e microbiologiche.

MATERIALI E METODI

Animali

Centonovantadue suini deceduti in cinque aziende a ciclo chiuso della provincia di Cuneo tra luglio 2019 e dicembre 2021 sono stati sottoposti ad esame necroscopico standard presso il Dipartimento di Scienze Veterinarie di Torino. Gli animali sono stati suddivisi in base al peso

nelle categorie post svezzamento (PS-6.5 – 30 Kg), e ingrasso (I- >30 Kg), e classificati come casi respiratori (CR), enterici (CE) o sistemici (CS) in relazione al quadro anatomo-patologico osservato. Il processo patologico era circoscritto prevalentemente a livello toracico nei CR e a livello intestinale nei CE e sono stati considerati CS i suini che presentavano lesioni sia in cavità toracica che addominale e/o petecchie e/o linfoadenomegalia generalizzata.

Indagini microbiologiche

Le indagini microbiologiche sono state eseguite presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, sede di Torino e l'IZS della Lombardia ed Emilia Romagna, sede di Brescia su diversi organi a seconda delle classi di appartenenza:

- CR: polmoni, vie aeree superiori, amigdale e versamento pleuro-pericardico.
- CE: piccolo intestino, grosso intestino e feci.
- CS: polmone, milza, fegato, amigdale, linfonodi e midollo osseo. Midollo osseo e milza sono stati utilizzati per valutare la presenza di batteriemia.

Campioni di polmone, milza, fegato, amigdale, linfonodi, midollo osseo e vie aeree superiori sono stati sottoposti a esame colturale su terreno Agar sangue, Agar Gassner e Agar cioccolato ed incubate a 37°C in condizioni aerobiche e microaerofile per individuare eventuali colonie batteriche. Campioni di polmone sono stati poi utilizzati per la ricerca di *Mycoplasma hyopneumoniae,* PRRSV, virus dell'influenza suina e PCV2 mediante PCR. Gli intestini sono stati utilizzati per l'isolamento di *Brachyspira spp.* ed *E.coli*. I fattori di patogenicità riferibili ai diversi patotipi di *E.coli* sono stati caratterizzati mediante PCR. Le feci e gli intestini sono stati utilizzati anche per la ricerca biomolecolare di *Lawsonia intracellularis* e *Brachyspira spp*. Gli isolamenti batterici sono stati sottoposti a identificazione di genere e specie mediante MALDI-TOF (Bruker Daltonics).

Indipendentemente dalla classificazione macroscopica data all'animale, gli isolamenti batterici sono stati suddivisi in tre categorie adattando le indicazioni contenute nella "Swine Bacterial Matrix" (Swine Health Information Center, 2021):

- Patogeni primari, noti per indurre infezione e flogosi nel suino: *Streptococcus spp* (*S. suis*, *S. dysgalatiae*, *S. agalatiae* e *S. porcinus*), *E. coli*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Glaesserella parasuis*, *Salmonella spp* e *S.* nuova variante monofasica, Stafilococchi coagulasi positivi *(S. aureus,* S. hyicus), *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira spp*.
- Patogeni primari/secondari, che possono indurre infezione da soli o in presenza di un agente patogeno primario: *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, *Trueperella pyogenes* e *Pseudomonas aeruginosa*
- Non patogeni od opportunisti ambientali, microrganismi ubiquitari del tratto gastro-enterico, respiratorio, del suolo e dell'acqua. I risultati di tali isolamenti non sono stati riportati data la mancanza di significato patologico.

Campioni di fegato e polmone sono stati sottoposti alla ricerca di sostanze inibenti per individuare il potere antibatterico residuo causato da trattamenti antibiotici *in vivo*, incubandoli in piastra con un inoculo di *Bacillus subtilis*. Il test è stato considerato positivo in presenza di un alone attorno al frammento, indicativo di inibizione della crescita batterica.

Esami istologici

Quarantadue campioni di polmone, linfonodi, intestino, milza, fegato, rene e cervello sono stati selezionati in base ai reperti macroscopici, prelevati e fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e processati routinariamente per l'esame istologico. I campioni così ottenuti sono stati valutati al microscopio ottico.

Analisi statistica
L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software R versione 4.0.4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; http://www.r-project.org.). I dati sono stati descritti come numero di animali (n) e percentuale (%) in relazione alla variabile categoria di peso (PS o I), sesso, causa di morte infettiva o non infettiva. Il test esatto di Fisher è stato utilizzato per valutare se la presenza di PCV2/PRRSV e i principali batteri isolati nei casi respiratori e sistemici mostravano una relazione tra loro.

RISULTATI

Animali
Le patologie infettive sono state registrate come la principale causa di morte in entrambe le categorie (93.7% in PS; 85.7% in I). A seguito del rilevamento di polisierositi fibrinose, il 56.7% dei post-svezzamento e il 28.6% degli ingrassi è stato classificato come CS. Nel 35.8% dei post-svezzamento e nel 57.1% degli ingrassi, gli animali sono stati classificati come CR per la presenza di pleuriti fibrinose e broncopolmoniti catarral–purulente. Il 7.5% dei post-svezzamento e il 14.3% degli ingrassi presentava enterite acuta ed è stato classificato come CE. Solo il 6.3% delle morti in post-svezzamento e il 14.3% di quelle in ingrassi è stato attribuito a cause non infettive, in particolare, ernie ombelicali, traumi e patologie cardiache.

Indagini microbiologiche
Tra i CR, i patogeni più frequentemente riscontrati nei polmoni sono stati *Streptococcus spp*. (50% PS; 60% I) ed *E. coli* (25% PS; 33.3% I). Nei post-svezzamento sono stati registrati anche 4 casi di salmonellosi (14.3%), di cui 3 da S. Typhimurium variante monofasica 4,[5],12:i:-.
Nei 13 CE i patogeni più frequentemente isolati nel piccolo intestino e nelle feci sono stati *E. coli* ETEC (n= 4 PS; n=3 I), *Brachyspira* spp. (n=4 PS) e MST (n=2 PS).
Tra i 74 CS con isolamento batterico, 43 sono stati confermati anche microbiologicamente come sistemici, mostrando positività da midollo osseo e/o presentando lo stesso isolamento da almeno 2 organi posti in due differenti distretti. I principali patogeni isolati sono stati: *Streptococcus spp*. ed *E. coli.*
Indipendentemente da categoria e classificazione, non è stata evidenziata nessuna relazione tra la presenza di PRRS/PCV2 e *Streptoccoccus spp*. o *E. coli*.
La ricerca inibenti è risultata positiva in 2 polmoni e 11 fegati di soggetti post-svezzamento e in un polmone in ingrasso.
A livello polmonare, 59 soggetti su 132 (44.7%) sono risultati positivi per PCV2, 121 (91.7%) presentavano PRRS e solo un post-svezzamento ha mostrato positività per il virus dell'influenza suina (0.8%). Inoltre, 25 soggetti su 137 (18.2%) presentavano *Mycoplasma hyopneumoniae*. La prevalenza di questi agenti in post-svezzamento e ingrasso e nei CS e CR è riportata nel Grafico 1.

Grafico 1. Positività per *M. hyopneumoniae* e per i principali virus riscontrate nei CR e CS di entrambe le categorie (PS e I).

Esami istologici
I polmoni positivi a PRRSV e/o PCV2 mostravano quadri di polmonite interstiziale, complicata da infiltrati neutrofilici in caso di infezione batterica.
Gli intestini esaminati (positivi per *E. coli* e MST) mostravano enterite acuta, villi atrofici e fusi tra loro con fenomeni di necrosi, più gravi nell'enterite da *Salmonella*.

DISCUSSIONE

La maggioranza dei suini deceduti sono stati suini in post-svezzamento, mentre il numero dei suini all'ingrasso esaminati è stato di molto inferiore. Tra i post-svezzamento prevalgono i CS, mentre nei suini all'ingrasso sono stati registrati soprattutto CR. Infatti, lo svezzamento è considerato il momento più critico dell'allevamento suino (Barba-Vidal et al., 2018). I post-svezzamento sono più predisposti alle infezioni, soprattutto sistemiche, perché il loro sistema immunitario mucosale già immaturo (Chase e Lunney, 2019) viene ulteriormente depresso dallo stress indotto da: separazione dalla madre, rimescolamento delle nidiate e cambiamento della dieta. Invece, i suini all'ingrasso dispongono di maggiore capacità di termoregolazione e di un sistema immunitario più maturo, ma l'alta densità di animali determina alti livelli di ammoniaca, polvere e batteri dispersi nell'aria, correlati a infezioni respiratorie, che costituiscono la principale causa di morte in questa categoria (Maes et al., 2004).

A differenza di quanto riportato in letteratura per i suini all'ingrasso (Gebhardt et al., 2020), nel nostro studio, le cause di morte non infettive più frequenti sono risultate le ernie ombelicali.

Nei CR il patogeno più isolato nei polmoni è stato *Streptococcus spp*., molto comune nelle forme respiratorie dei post-svezzamento e negli ingrassi, anche se con minor frequenza (Obradovic et al., 2021). Il secondo agente eziologico riscontrato a livello polmonare è stato *E. coli.* Di recente sono stati descritti casi respiratori associati ad *E. coli* patogeni extraintestinali (ExPEC) in cui i suini presentavano emorragie polmonari, senza lesioni rilevanti negli altri apparati (Kong et al., 2017). È possibile, quindi, che alcuni *E. coli* causino forme setticemiche senza lesioni macroscopiche intestinali evidenti o che lievi quadri di enterite possano essere sottovalutati, soprattutto in post-svezzamento, perché forme più o meno gravi di disbiosi sono comuni in questa fase produttiva.

Nei CE dei post-svezzamento, il riscontro di *E. coli* ETEC, *Brachispira spp.* e MST è conseguente all'instabilità del microbiota, alterato a causa dei rapidi cambiamenti gestionali e alimentari di questa fase, che predispongono i post-svezzamento ad infezioni enteriche. Il principale patogeno associato a diarrea e riduzione della crescita è *E. coli* ETEC (Fouhse et al., 2016), ma anche *Brachyspira* spp. che colpisce soprattutto i suini in fase di ingrasso/finissaggio (Hampson e Burrough, 2019). Tuttavia, uno studio ha riscontrato un aumento di positività a MST, soprattutto nei post-svezzamento, associato a una diminuzione dei casi di *S.* Typhimurium a partire dal 2008 (D'Incau et al., 2021). Negli ingrassi, invece, i risultati del presente studio sono in contrasto con la letteratura secondo cui batteri più frequentemente isolati nelle forme enteriche dovrebbero essere *Lawsonia intracellularis* (44.59%) *Salmonella spp*. (31%) e, in ultimo, *E. coli* (8.11%) (Merialdi et al., 2003).

Nei CS i principali isolamenti sono stati *Streptococcus spp*. ed *E. coli.* Infatti, ceppi virulenti di *S. suis* possono colonizzare le alte vie respiratorie dei suini alla nascita e causare infezioni sistemiche dopo lo svezzamento a causa della riduzione degli anticorpi materni (Correa-Fiz et al., 2020). Negli ingrassi, i casi di mortalità da streptococcosi sistemica non sono molto frequenti, ma possono essere conseguenti a criticità gestionali (Maes et al., 2004).-

Riguardo a *E. coli,* la maggior parte dei casi di colibacillosi sistemica riscontrati nel nostro studio presentavano co-infezioni sistemiche (streptococchi, salmonelle) e nei post-svezzamento si associavano a peso e BCS ridotti.

La mancata associazione tra PRRSV/PCV2 e *Streptococcus spp.* o *E. coli è in* disaccordo con studi precedenti.

Il PRRSV e il PCV2 favoriscono infatti l'infezione da parte di altri virus e batteri opportunisti per la loro attività immuno-soppressiva (Gómez-Laguna et al., 2013; Wang, et al., 2020). Tuttavia, in questo studio non sono stati presi in considerazione i focolai di PRRSV clinicamente manifesta, durante i quali gli animali vanno incontro a infezioni da *S. suis* più gravi. In caso di infezione endemica, entrambi i patogeni possono essere presenti in allevamento senza

che gli animali mostrino particolari segni clinici (Obradovic et al., 2021). Comunque, la mancata associazione nel presente studio tra infezioni virali e batteriche potrebbe essere influenzata dal numero esiguo di casi registrati.
Le positività a PRRSV sono state riscontrate soprattutto nei post-svezzamento, probabilmente perché il virus persiste più a lungo e con titoli più elevati nei soggetti giovani (Zimmermann et al, 2019). Per quanto riguarda *M. hyopneumoniae,* le basse positività riscontrate sono in disaccordo con la letteratura, perché *è un patogeno comune, soprattutto* nei suini dalle 10 alle 22 settimane di età (Van Reeth e Vincent, 2019). Le ridotte positività ad influenza potrebbero invece riflettere il decorso rapido della malattia e la bassa mortalità, solitamente <1%, in caso di infezioni non complicate (Van Reeth e Vincent, 2019).
Considerando i CS, non tutti i casi sono stati confermati dagli esami microbiologici come sistemici. La classificazione delle forme sistemiche si dovrebbe sempre basare sia sui reperti necroscopici che microbiologici in quanto la ridotta carica batterica, la presenza di processi cronici purulenti dove i batteri nell'essudato sono ormai privi di capacità replicativa rendono difficile l'isolamento batterico. Inoltre, il trattamento antibiotico somministrato all'animale e la conseguente presenza di potere antibatterico residuo, riscontrabile con il test degli inibenti può impedire l'isolamento batterico soprattutto nei post-svezzamento, perché il 69% degli antibiotici vengono somministrati dopo lo svezzamento (Sjölund et al., 2016).
Infine, i quadri istopatologici rilevati in associazione con gli isolamenti microbiologici sono risultati in accordo con la letteratura.

CONCLUSIONE

Le malattie infettive costituiscono la principale causa di morte negli allevamenti suini considerati e nei post-svezzamento si registrano tassi di mortalità più elevati, caratterizzati soprattutto da processi infettivi sistemici. Negli ingrassi, invece, le infezioni rimangono localizzate a livello dell'apparato respiratorio. I patogeni più frequentemente coinvolti sono stati *Streptococcus spp.* ed *E. coli* per gli agenti batterici, e PRRSV per quelli virali, analogamente a quanto riportato in letteratura. Ulteriori studi sono necessari per valutare l'antibiotico-resistenza dei ceppi batterici isolati e l'utilizzo degli antibiotici in allevamento. Infine, implementare le misure di biosicurezza in allevamento potrebbe ridurre l'impatto di tali infezioni sulla produttività e sul consumo di antimicrobici.

RINGRAZIAMENTI. Si ringrazia la Fondazione Cassa di Risparmio di Torino per il supporto economico del progetto (Erogazione ordinaria progetto RF 2019.0626 "Antibiotico resistenza negli allevamenti suini: sorveglianza in vivo e post-mortem in aziende categorizzate con il sistema ClassyFarm")

BIBLIOGRAFIA

1. Barba-Vidal, E., Martín-Orué, S. M., & Castillejos, L. (2018). Review: Are we using probiotics correctly in post-weaning piglets? *Animal*, *12*(12), 2489–2498.
2. Chase C., Lunney J. K., (2019) Immune System. In: Zimmerman J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, WileyBlackwell, Hoboken, NJ, 27
3. Chauvin, C., Beloeil, P. A., Orand, J. P., Sanders, P., & Madec, F. (2002). A survey of group-level antibiotic prescriptions in pig production in France. *Preventive Veterinary Medicine*, *55*(2), 109–120.
4. Cloutier, G., D'allaire, S., Martinez, G., Surprenant, C., Lacouture, S., & Gottschalk, M. (2003). Epidemiology of Streptococcus suis serotype 5 infection in a pig herd with and

without clinical disease. *Veterinary Microbiology*, *97*(1–2), 135–151.
5. Correa-Fiz, F., Neila-Ibáñez, C., López-Soria, S., Napp, S., Martinez, B., Sobrevia, L., Tibble, S., Aragon, V., & Migura-Garcia, L. (2020). Feed additives for the control of post-weaning Streptococcus suis disease and the effect on the faecal and nasal microbiota. *Scientific Reports*, *10*(1).
6. Davies, P. R. (2012). One world, one health: the threat of emerging swine diseases. A North American perspective. *Transboundary and Emerging Diseases*, *59 Suppl 1*(SUPPL. 1), 18–26.
7. D'Incau, M., Salogni, C., Giovannini, S., Ruggeri, J., Scali, F., Tonni, M., Formenti, N., Guarneri, F., Pasquali, P., & Alborali, G. L. (2021). Occurrence of Salmonella Typhimurium and its monophasic variant (4, [5],12:i:-) in healthy and clinically ill pigs in northern Italy. *Porcine Health Management*, *7*(1).
8. Drew, T. W. (2011). The emergence and evolution of swine viral diseases: to what extent have husbandry systems and global trade contributed to their distribution and diversity? *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, *30*(1), 95–106.
9. Fairbrother J. M., Nadeau E., (2019) Colibacillosis. In: Zimmerman J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, WileyBlackwell, Hoboken, NJ, 807 – 834
10. Fertner, M., Boklund, A., Dupont, N., Enøe, C., Stege, H., & Toft, N. (2015). Weaner production with low antimicrobial usage: A descriptive study. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *57*(1), 1–8.
11. Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T., & Willing, B. P. (2016). The role of gut microbiota in the health and disease of pigs. *Animal Frontiers*, *6*(3), 30–36.
12. Gebhardt, J. T., Tokach, M. D., Dritz, S. S., DeRouchey, J. M., Woodworth, J. C., Goodband, R. D., & Henry, S. C. (2020). Postweaning mortality in commercial swine production. I: review of non-infectious contributing factors. *Translational Animal Science*, *4*(2), 462–484.
13. Gómez-Laguna, J., Salguero, F. J., Pallarés, F. J., & Carrasco, L. (2013). Immunopathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome in the respiratory tract of pigs. *The Veterinary Journal*, *195*(2), 148–155.
14. Hampson D. J., Burrough E. R., (2019) Swine Dysentery and Brachyspiral Colitis. In: Zimmerman J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 951 – 970.
15. Harris D. L. (2000). In: Harris D. L. (ed) Multi-site Pig Production, Iowa State University Press, South State Avenue Ames, Iowa, 7-95. Jensen, V. F., Emborg, H. D., & Aarestrup, F. M. (2012). Indications and patterns of therapeutic use of antimicrobial agents in the Danish pig production from 2002 to 2008. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *35*(1), 33–46.
16. Kim, J., Chung, H.-K., & Chae, C. (2003). Association of porcine circovirus 2 with porcine respiratory disease complex. *The Veterinary Journal*, *166*(3), 251–256.
17. Kong, L. C., Guo, X., Wang, Z., Gao, Y. H., Jia, B. Y., Liu, S. M., & Ma, H. X. (2017). Whole genome sequencing of an ExPEC that caused fatal pneumonia at a pig farm in Changchun, China. *BMC Veterinary Research*, *13*(1).
18. Maes, D. G. D., Duchateau, L., Larriestra, A., Deen, J., Morrison, R. B., & de Kruif, A. (2004). Risk factors for mortality in grow-finishing pigs in Belgium. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *51*(7), 321–326.
19. Merialdi, G., Bonilauri, P., Granelli, F., Luppi, A., & Dottori, M. (2003). Bacterial pathogens in field cases of clinical colitis in growing and finishing pigs in Italy. *The Veterinary Record*, *153*(17), 529–530.

20. Obradovic, M. R., Segura, M., Segalés, J., & Gottschalk, M. (2021). Review of the speculative role of co-infections in Streptococcus suis-associated diseases in pigs. In *Veterinary Research* (Vol. 52, Issue 1). BioMed Central Ltd.
21. Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Emanuelson, U., Grosse Beilage, E., Stärk, K. D. C., & Dewulf, J. (2016). The biosecurity status and its associations with production and management characteristics in farrow-to-finish pig herds. *Animal*, *10*(3), 478–489.
22. Sjölund, M., Postma, M., Collineau, L., Lösken, S., Backhans, A., Belloc, C., Emanuelson, U., Beilage, E. G., Stärk, K., Dewulf, J., Beilage, E. G., GrosseLiesner, B., Körk, C. A., Lindberg, A., Seemer, H., & Visschers, V. (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.
23. Thomson J. R., Friendship R. M., (2019). Digestive System, In. Zimmermann J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 243 – 250.
24. VanderWaal, K., & Deen, J. (2018). Global trends in infectious diseases of swine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(45), 11495–11500.
25. Van Reeth K., Vincent A. L. (2019) Influenza Viruses. In: Zimmermann J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, WileyBlackwell, Hoboken, NJ, 576- 593.
26. Wang, Q., Zhou, H., Lin, H., Ma, Z., & Fan, H. (2020). Porcine circovirus type 2 exploits JNK-mediated disruption of tight junctions to facilitate Streptococcus suis translocation across the tracheal epithelium. *Veterinary Research*, *51*(1).
27. Zimmermann J. J, Scott A. D., Holtkamp D.J., Murtaugh M.P., Stadejek T., Stevenson G.W., Torremorell M., Yang H., Zhang J., (2019) Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arteriviruses) In. Zimmerman J. J, Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., Zhang J., Diseases of Swine, Wiley-Blackwell, Hoboken, NJ, 685-708.

SITOGRAFIA

"Swine Bacterial Disease Matrix – Swine Health Information Center." 2021. https://www.swinehealth.org/swine-bacterial-disease-matrix/.

BENEFICI DI HEPARENOL (MANGIME COMPLEMENTARE A BASE DI COLINA CLORURO ED ESTRATTI VEGETALI) SOMMINISTRATO ALLE SCROFE IN PREPARTO SULLA PERCENTUALE DI SUINETTI NATI MORTI

BENEFICIAL EFFECTS OF INTEGRATION OF HEPARENOL (A CHOLINE CHLORIDE AND PLANT BASED FEED SUPPLEMENT) ADMINISTERED TO PREPARTUM SOWS ON PERCENTAGE OF STILLBORN PIGLET

ENGELEN B.

Dopharma BV – The Netherland

Parole chiave: Scrofe iperprolifiche, percentuale suinetti nati morti, integrazione alimentare, colina cloruro, epatoprotettore.
Keywords*:* Hyper-prolific sows, stillbirth rate, supplementary feed, choline chloride, hepatoprotector

RIASSUNTO
Assieme all'aumento della produttività delle scrofe, anche la percentuale di suinetti nati morti è aumentata negli ultimi anni. Obiettivo di questo studio era provare che un'integrazione a supporto dell'attività epatica potesse diminuire l'incidenza di suinetti nati morti da scrofe iperprolifiche. Sono state eseguite due prove randomizzate con controllo in due diversi allevamenti, entrambi con scrofe altamente produttive. I due studi mostrano il positivo effetto dell'integratore alimentare testato, somministrato durante la gestazione, sul numero di suinetti nati morti in scrofe iperprolifiche ad alto rischio.

ABSTRACT
Along with increased productivity of sows, the percentage of stillborn piglets has increased in recent years. The objective of this study was to investigated if a liver supporting supplementary feed could decrease the percentage of stillborn piglets in hyper-prolific sows. Two controlled and randomized trials were performed at two different farm with high productive sows. Both studies show the beneficial effect of the investigated supplementary feed on stillbirths in high risk hyper-prolific sows during late gestation.

INTRODUZIONE
Nei decenni scorsi le scrofe sono state selezionate per avere numerosi suinetti al parto. Ciò ha portato ad un aumento di 0,2 ovulazioni per anno negli ultimi 35 anni[1]. Questo trend genetico ha fatto in modo di avere scrofe iperprolifiche con elevato numero di suinetti al parto quale evento normale nel ciclo produttivo. Per esempio, il numero di suinetti per parto in Danimarca è salito da 11,2 nel 1996 a 14,8 nel 2011 anche se questa crescita non è la stessa nei diversi mercati. In Gran Bretagna il numero di suinetti per parto è cresciuto da 10,8 a 11,4 nello stesso periodo[2]. Negli ultimi anni il numero di suinetti per parto in Danimarca è ulteriormente salito a 17,5 suinetti nati vivi nel 2019[3]. Ad ogni modo, oltre al raggiungimento dell'obiettivo di ottenere scrofe altamente produttive, si è fatto largo anche un certo interesse a riguardo di eventuali implicazioni negative sul benessere animale[2,4,5]. Una delle conseguenze dell'aumento del numero di suinetti per parto è un incremento del numero dei soggetti nati morti e dell'elevata mortalità dei suinetti durante la lattazione con medie fino al 10% e 15% rispettivamente[3].

Le cause che portano ad avere suinetti nati morti hanno alimentato numerose ricerche. Molti fattori di rischio sono stati identificati. In un'analisi completa è stato mostrato che numero di suinetti per parto, numero del parti, condizione corporea della scrofa e controllo dei nati/ assistenza al parto erano importanti fattori di rischio, collegati al numero di suinetti nati morti[6]. Altri ricercatori hanno individuato, quali elementi coinvolti nell'aumentata probabilità di avere suinetti morti alla nascita[11], fattori come lunghezza della gestazione[7,8,9], durata del parto[10,2], trattamenti farmacologici, controllo durante il parto, peso medio dei suinetti alla nascita e peso della scrofa. La maggior parte dei soggetti nati morti perisce durante il parto a causa di carenza di ossigeno[12].
Oliviero et al.[10] hanno analizzato i fattori che nella scrofa avevano effetto sulla durata del parto. La conclusione è che consentire alla scrofa di muoversi liberamene prima del parto, ridurre la costipazione ed evitare l'eccessivo ingrassamento durante le fasi finali della gravidanza, paiono essere fattori chiave nel diminuire la durata del parto e nel ridurre la mortalità perinatale. Più recentemente sono stati studiati gli effetti dello stato energetico della scrofa durante il parto relativamente alla durata del parto stesso e al numero di suinetti nati morti[13]. La conclusione è che un sostanziale numero di scrofe a inizio parto presenta un basso livello energetico e questo impatta negativamente sull'intero parto. Fornire alle scrofe un'integrazione ricca in fibre produce effetto positivo sul livello energetico a inizio parto, riducendo significativamente il numero di suinetti nati morti[14].
Si può concludere che il problema dei suinetti nati morti è spesso di carattere multifattoriale e può essere complicato migliorare la situazione negli allevamenti. Nel 2018 un allevamento con scrofe iperprolifiche situato in Olanda presentava un aumento di casi di soggetti morti alla nascita che passava dal 9,2% nella seconda metà del 2018 all'11,5% nella prima parte del 2019. Il numero di suinetti nati vivi si alzò passando dal 15,7 al 16,7 rispettivamente negli stessi periodi. Gli allevatori, assieme ai loro team di collaboratori, esclusero numerosi fattori di rischio tra cui strategia alimentare e composizione della razione. Durante la fase di individuazione di una soluzione al problema, fu notato che molte scrofe nella fase finale della gestazione presentavano nel siero alti livelli di aspartato aminotransferasi (AST) e di acidi grassi non esterificati (NEFA). Si pensò che la funzionalità epatica delle scrofe potesse essere compromessa a causa del negativo bilancio energetico nella fase finale della gestazione e che ciò potesse essere messo in relazione con l'aumento dei suinetti nati morti. La specificità di questo possibile legame non è stata spesso soggetto di studi, sebbene in molte specie animali un equilibrio negativo dell'energia durante il periodo produttivo possa portare a malfunzionamento epatico a causa di accumulo di grasso a livello del fegato[15,16]. Di conseguenza noi abbiamo cercato di investigare se un integratore alimentare a supporto dell'attività epatica potesse contribuire a diminuire la percentuale di suinetti nati morti in questo allevamento. In aggiunta, è stata effettuata una seconda prova in un altro allevamento che presentava un problema analogo. L'integrazione alimentare analizzata conteneva colina, metionina, lisina, sorbitolo ed estratti vegetali. La colina è uno dei principali component e contribuisce al mantenimento delle normali funzionalità del fegato.

MATERIALI E METODI

Prova 1. Una prova randomizzata con controllo è stata condotta nell'allevamento con Scrofe Danesi altamente produttive. Un Gruppo di scrofe per le quali era prevista la stessa settimana di parto è stato diviso in un gruppo di 79 scrofe alle quali è stato somministrato l'integratore e un gruppo di controllo di 114 scrofe. Il gruppo alimentato con l'integrazione ha ricevuto 45 mL di un integratore liquido (Heparenol, Dopharma France S.A.S.) a partire da 10 giorni prima della data attesa del parto, fino al giorno del parto stesso. L'integrazione è stata somministrata una volta al giorno, nell'alimento liquido. Seguendo le usuali procedure dell'allevamento, sono stati registrati i suinetti nati vivi e suinetti nati morti. La percentuale di soggetti nati morti (suinetti

nati morti per scrofa/totale suinetti nati per scrofa) è stata statisticamente analizzata da ANOVA per l'effetto del trattamento, con la durata della gestazione come variabile qualitativa.
Prova 2. Una prova randomizzata con controllo è stata condotta in un allevamento con Scrofe TN70 altamente produttive. Un gruppo di 104 scrofe al quarto parto e un gruppo di 104 scrofe al sesto parto consecutivo sono stati egualmente divisi in gruppo con integrazione e gruppo di controllo. Una volta al giorno sono stati somministrati 45 mL di un integratore liquido (Heparenol, Dopharma France S.A.S.), distribuiti sopra all'alimento secco, dal momento in cui gli animali entravano nella sala parto fino al giorno del parto stesso. Seguendo le usuali procedure dell'allevamento, sono stati registrati i suinetti nati vivi e i suinetti nati morti. La percentuale di soggetti nati morti da scrofe ad alto rischio (≥ 4° parto e lunghezza della gestazione < 115 giorni) è stata statisticamente analizzata da ANOVA per l'effetto del trattamento, con il numero di parti come variabile non qualitativa.

RISULTATI

Prova 1. La durata media della somministrazione di integrazione nel rispettivo gruppo è stata di 10 giorni. La percentuale media di suinetti nati morti è stata di 11,3% comparata a 15,3% nel controllo. La differenza di 4,1% ($p = 0,026$) corrispondeva a 0,77 suinetti per scrofa.
Prova 2. In totale 71 scrofe trattate e 76 scrofe di controllo (≥ 4° parto) hanno avuto lunghezza della gestazione inferiore a 115 giorni. La durata media della somministrazione di integrazione è stata di 6 giorni. La percentuale media di suinetti nati morti nelle scrofe trattate è stata dell'8,6% comparata al 13,1% nel controllo. La differenza di 4,5% ($p = 0,008$) corrispondeva a 0,93 suinetti per scrofa.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Nella Prova 1, relativamente alla percentuale di suinetti nati morti tra gruppo con integrazione e controllo, è stata rilevata una differenza statisticamente non significativa pari al 3,1% (11,8% vs 14,9%; $p = 0,08$). C'era comunque un effetto lineare statisticamente significativo della lunghezza della gestazione (113-117 giorni) sulla percentuale di soggetti nati morti nel gruppo di controllo ma non in quello con integrazione. Ciò avvalora l'ipotesi che un negativo equilibrio energetico nella fase avanzata della gestazione possa essere coinvolto nell'insorgenza di parti prematuri e nell'aumento del numero di suinetti nati morti. Tenendo presente questo effetto, analizzando i risultati considerando la durata della gestazione come variabile qualitativa, è stata calcolata la differenza percentuale statisticamente significativa di suinetti nati morti pari a 4,1% (che corrisponde a 0,77 suinetti per scrofa) tra gruppo con integrazione e gruppo di controllo nella Prova 1 ($p = 0,026$).
L'allevamento nella Prova 1 non mostrava alcuna relazione del numero di gravidanze sull'alta percentuale di suinetti nati morti, così sono stati analizzati i dati di ciascuna scrofa nel gruppo con l'integrazione e nel gruppo di controllo. Tuttavia l'allevamento della Prova 2 presentava un numero di suinetti nati morti statisticamente significativo più elevato nel gruppo delle scrofe al 4° parto e oltre, rispetto al gruppo di scrofe più giovani. Pertanto, sono state indicate come scrofe a rischio quelle al 4° parto e oltre, con una lunghezza della gestazione di meno di 115 giorni. Nella Prova 2 sono state analizzati i dati di queste scrofe ad alto rischio.
Il passaggio dall'omeoresi della gestazione all'omeoresi della lattazione in relazione alla sindrome disgalassia post parto (SDPP) nelle scrofe è descritto molto bene da Martineau et al.[17]. Allo stesso modo è stato ipotizzato che la funzionalità epatica di scrofe altamente produttive potrebbe essere compromessa durante la gestazione inoltrata, il che potrebbe avere un ruolo nella patogenesi dei suinetti nati morti. Questi studi mostrano infatti l'effetto benefico delle integrazioni analizzate, sulla mortalità alla nascita dei suinetti in scrofe iperproduttive ad alto rischio, nella fase finale della gestazione. Ad ogni modo, il ruolo della funzionalità compromessa del fegato

nelle scrofe e la relazione con i suinetti morti alla nascita non è ancora completamente chiara[18]. Per meglio comprendere se il fegato grasso in scrofe gravide sia un importante disordine metabolico, sono necessari ulteriori studi sulla loro diffusione, patogenesi e possibilità di diagnosi.

BIBLIOGRAFIA

1. Kemp B, Da Silva CLA, Soede NM. Recent advances in pig reproduction: Focus on impact of genetic selection for female fertility. Reprod Dom Anim. 2018;53(Suppl. 2):28–36
2. Rutherford KMD, Baxter EM, D'Eath RB, Turner SP, Arnott G, Roehe R, Ask B, Sandøe P, Moustsen VA, Thorup F, Edwards SA, Berg P, Lawrence AB. The welfare implications of large litter size in the domestic pig I: biological factors. Animal Welfare 2013;22:199-218 doi: 10.7120/09627286.22.2.199
3. Hansen H. Landgennemsnit for Produktivitet i Produktionen af Grise i 2019; SEGES Svineproduktion: Copenhagen, Denmark, 2020; p. 8.
4. Baxter EM, Rutherford KMD, D'Eath RB, Arnott G, Turner SP, Sandøe P, Moustsen VA, Thorup F, Edwards SA, Lawrence AB. The welfare implications of large litter size in the domestic pig II: management factors. Animal Welfare 2013;22:219-238 doi: 10.7120/09627286.22.2.219
5. Baxter EM, Schmitt O, Pedersen LJ, Farmer C (ed.) The suckling and weaned piglet. Wageningen: Wageningen Academic Publishers;2020 doi 10.3920/978-90-8686-894-0_3
6. Vanderhaeghe C, Dewulf J, De Kruijf A, Maes D. Non-infectious factors associated with stillbirth in pigs: A review. Animal Reproduction Science 2013;139:76–88
7. Leenhouwers J, Van der Lende T, Knol EF. Analysis of stillbirth in different lines of pigs. Livestock Production Science 1999;57(3):243-253
8. Nam NH and Sukon P. Risk factors associated with stillbirth in swine farms in Vietnam. World Vet J 2020;10(1):74-79
9. Nam NH and Sukon P. Non-infectious risk factors for intrapartum stillbirth in a swine farm in the North of Vietnam. Vet World. 2021 Jul; 14(7): 1829–1834.
10. Oliviero C, Heinonen M, Valros A, Peltoniemi O. Environmental and sow-related factors affecting the duration of farrowing. Anim. Reprod. Sci. 2010;119:85–91
11. Le Cozler Y, Guyomarc'H C, Pichodo X, Quinio PY, Pellois H. Factors associated with stillborn and mummified piglets in high-prolific sows. Anim. Res. 2002;51:261–268
12. Randall GCB. The relationship of arterial blood pH and pCO2 to the viability of the newborn piglet. Can. J. Comp. Med. 1971, 35, 141–146.
13. Feyera T, Federsen TF, Krogh U, Foldager L, Theil PK. Impact of sow energy status during farrowing on farrowing kinetics, frequency of stillborn piglets, and farrowing assistance. J. Anim. Sci. 2018;96:2320–2331
14. Feyera T, Højgaard CK, Vinther J, Bruun TS, and Theil PK. Dietary supplement rich in fiber fed to late gestating sows during transition reduces rate of stillborn piglets. J. Anim. Sci. 2017;95:5430–5438
15. Crespo R, Shivaprasad HL, Saif YM (ed.) Developmental, metabolic, and other noninfectious disorders. Chapter 30 in Diseases of Poultry 12th edition. Ames, Iowa: Blackwell Pubishing;2008.
16. Haass, CL. and Eness, PG. Bovine Fatty Liver Syndrome," Iowa State University Veterinarian. 1984;46(2):108-111
17. Martineau GP, Le Treut Y, Guillou D, Waret-Szkuta A. Postpartum dysgalactia syndrome: A simple change in homeorhesis? J Swine Health Prod. 2013;21(2):85-93
18. Geudeke M, Meijerink M, Counotte G, Junker K. Fatty livers in sows and role of trace elements. Proceedings of the 7th European Symposium of Porcine Health Management; 2015; Nantes, France

FIBROSARCOMI ASSOCIATI ALLE MARCHE AURICOLARI NEL SUINO: CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE

PORCINE EAR-TAG ASSOCIATED FIBROSARCOMA: PATHOLOGICAL FEATURES

ROSAMILIA A.[1], HATTAB J.[2], CAPEZZUTO S.[1], MARRUCHELLA G.[2]

[1]Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Azienda Unità Sanitaria Locale di Modena, via S. Giovanni del Cantone 23, 41121, Modena;
[2]Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano d'Accio, 64100, Teramo.

Parole chiave: marche auricolari, fibrosarcoma
Keywords: ear tags, fibrosarcoma

RIASSUNTO
Le neoplasie del suino sono rare, solitamente asintomatiche e osservate incidentalmente al momento della macellazione. Pertanto, la loro descrizione è sottostimata e spesso incompleta. Nel presente contributo vengono riferite le principali caratteristiche morfologiche di tre lesioni neoplastiche auricolari, recentemente osservate in un macello del Nord Italia. Le lesioni, intimamente associate alla presenza di marche auricolari, erano di notevoli dimensioni, molto dure alla palpazione e coinvolgevano entrambe le superfici cutanee del padiglione. In base ai quadri microscopici osservati, è stata formulata la diagnosi di fibrosarcoma. Lo sviluppo di neoplasie associate alla presenza di corpi estranei, ivi comprese le marche auricolari, è stato documentato in diverse specie animali. Con una prevalenza stimata di circa 1 caso ogni 25-50000 suini macellati, i fibrosarcomi auricolari rappresenterebbero la neoplasia più frequente nella specie suina, fornendo un utile modello di studio in oncologia comparata.

ABSTRACT
Swine neoplasms are rare, usually asymptomatic and occasionally observed at the time of slaughtering. Therefore, their description is likely underestimated and often incomplete. We report herein the main pathological features of three neoplastic lesions, which have been recently observed in slaughtered pigs in Northern Italy. Such lesions involved both ear sides and were very large, hard and closely associated with ear tags. Based on their microscopic features, the diagnosis of fibrosarcoma was made. The development of neoplasms associated with the presence of foreign bodies, including ear tags, has been documented in different animal species. With an estimated prevalence of about 1 case per 25-50000 slaughtered pigs, ear tag-associated fibrosarcoma would represent the most frequent neoplasm in pigs, providing a useful model in the field of comparative oncology.

INTRODUZIONE
La patologia neoplastica del suino è a dir poco rara, condizionata com'è dal breve ciclo produttivo di questa specie animale. L'unica eccezione alla regola è rappresentata dai suini allevati come *pets*, che vivono molto più a lungo e nei quali sono riportate con relativa frequenza neoplasie del tratto genitale, epatiche e gastroenteriche (Newman e Rohrbach, 2012).
Nella maggior parte dei casi, le neoplasie del suino costituiscono un reperto occasionale di macellazione, dal momento che gli animali affetti non riescono a sviluppare

manifestazioni cliniche rilevanti nell'arco di pochi mesi di vita (Robinson et al., 2019). Va da sé che la loro descrizione è sottostimata, spesso sommaria e non sempre suffragata da idonei approfondimenti diagnostici di laboratorio (indagini istopatologiche ed immunoistochimiche).
Recentemente, Morey-Matamalas et al. (2021) hanno pubblicato un'interessante indagine retrospettiva, frutto di 20 anni di osservazioni in macelli della Catalogna. Come atteso, la frequenza delle lesioni neoplastiche è stata davvero molto bassa (media <0.2 casi/10^6 suini macellati), con netta prevalenza di linfomi (50%) e melanomi (12.5%).
Il presente contributo si pone l'obiettivo di descrivere le principali caratteristiche, macroscopiche e microscopiche, di lesioni neoplastiche auricolari recentemente osservate in sede di macellazione.

MATERIALI E METODI

I tre casi qui descritti sono stati osservati in un macello ad alta capacità del Nord Italia. Il padiglione auricolare coinvolto è stato asportato e fotografato. Campioni rappresentativi di tessuto sono stati fissati in formalina neutra tamponata al 10%, inclusi in paraffina e processati come da prassi per i necessari approfondimenti istopatologici (colorazione ematossilina-eosina).

RISULTATI

Le lesioni erano in tutti i casi associate alla presenza di marche auricolari di materiale plastico. Di forma "sferica", di notevoli dimensioni (6-8 cm di diametro) e ulcerate, le lesioni sporgevano nettamente – seppur in modo asimmetrico – su entrambe le superfici cutanee del padiglione auricolare. Alla palpazione risultavano estremamente ed omogeneamente consistenti. In sezione di taglio, le neoformazioni erano di colore bianco-grigiastro, con una fitta trama di setti connettivali e aree circoscritte di necrosi colliquativa (Figura 1).

Figura 1. Lesione ulcerata di notevoli dimensioni sulla superficie esterna del padiglione auricolare. Si noti la presenza della marca auricolare, parzialmente nascosta dalla neoformazione.
Figure 1. A large and ulcerated lesion can be observed on the external surface of the ear. Notably, an ear tag is present, partially hidden by the lesion.

Microscopicamente, si osservava una proliferazione neoplastica a cellule fusate, spesso organizzate in fasci variamente orientati nello spazio. Seppur con delle differenze anche all'interno dello stesso campione, le cellule mostravano un aspetto piuttosto omogeneo con evidente deposito di fibre collagene. Le figure mitotiche erano relativamente frequenti (0-2 mitosi/*hpf*) e talvolta atipiche. In alcune aree si evidenziava la presenza di piccoli granulomi, provvisti di cellule giganti multinucleate e associati a residui di "corpi estranei" (verosimilmente frammenti microscopici delle marche auricolari). Piuttosto comune anche il riscontro di infiltrati infiammatori linfo-plasmacellulari. Sulla scorta dei rilievi macroscopici e microscopici, è stata emessa la diagnosi di fibrosarcoma del padiglione auricolare.

DISCUSSIONE

Con una prevalenza stimata di 1 caso ogni 25-50000 suini macellati (Rosamilia, osservazioni personali), il fibrosarcoma associato all'applicazione delle marche auricolari sarebbe da ritenersi la neoplasia più frequente del suino. Ovviamente, il dato è viziato all'origine, poiché non tutti i suini vengono identificati con tali dispositivi (la prevalenza sarebbe ancora più elevata qualora la popolazione di riferimento fosse costituita esclusivamente dai suini con marche auricolari). A dispetto di ciò, in letteratura mancano descrizioni dettagliate di questa entità patologica. Per quanto a nostra conoscenza, attualmente è disponibile un unico *report* simile ("fibroma"), macroscopicamente identico a quanto da noi osservato e privo di documentazione microscopica (Gourreau et al., 2015).

La comparsa di neoformazioni in corrispondenza di una "lacerazione" dei tessuti potrebbe ingenerare il dubbio che si tratti di reazioni cicatriziali esuberanti, simil-tumorali ("cheloidi"). Tuttavia, gli aspetti microscopici consentono di dirimere la questione, confermando la natura neoplastica delle lesioni auricolari osservate.

Lo sviluppo di neoplasie associate alla presenza di "corpi estranei", nel senso più ampio del termine, è stato documentato a più riprese ed in diverse specie animali. Ad esempio, è descritta la comparsa di sarcomi nel sito d'impianto di *microchip* nel cane (Vascellari et al., 2006), nel gatto (Carminato et al., 2011) e nei roditori (Blanchard et al., 1999). Anche l'applicazione di marche auricolari è stata associata alla comparsa di neoplasie, per lo più di derivazione mesenchimale, negli animali da laboratorio (Waalkes et al., 1987), in una capra (Schoiswohl et al., 2019) e in un cervo a coda bianca (Roscoe et al., 1975). La patogenesi delle neoplasie da corpi estranei non è del tutto nota, ma è verosimilmente da ricondurre allo stimolo flogistico cronico che consegue al loro impianto. Tuttavia, non è da escludere il potenziale cancerogeno delle sostanze chimiche (es. poliuretano) utilizzate per la loro produzione (Kirkpatrick et al., 2000).

CONCLUSIONI

La patologia neoplastica del suino ha una rilevanza economica del tutto trascurabile. Ciononostante, sarebbe auspicabile prestare maggiore attenzione alla loro documentazione, che potrebbe fornire informazioni utili in patologia comparata. Nel caso specifico, i fibromi auricolari associati alle marche auricolari potrebbero essere un utile modello di studio, spontaneo e di "comune" rilievo, per meglio comprendere la patogenesi delle neoplasie indotte da corpi estranei.

BIBLIOGRAFIA

1. Blanchard K.T., Barthel C., French J.E., Holden H.E., Moretz R., Pack F.D., Tennant R.W., Stoll R.E. (1999) "Transponder-induced sarcoma in the heterozygous p53+/- mouse". Toxicol Pathol., 27(5), 519–527.

2. Carminato A., Vascellari M., Marchioro W., Melchiotti E., Mutinelli F. (2011) “Microchip-associated fibrosarcoma in a cat”. Vet Dermatol., 22(6), 565–569.
3. Gourreau J.M., Drolet R., Martineau G.P., Morvan H., Pastoret P.P., Pin D., Scott D.W. (2015) “Atlas of porcine dermatology”, Paris, OIE.
4. Kirkpatrick C.J., Alves A., Köhler H., Kriegsmann J., Bittinger F., Otto M., Williams D.F., Eloy R. (2000) “Biomaterial-induced sarcoma: A novel model to study preneoplastic change”. Am J Pathol., 156(4), 1455–1467.
5. Morey-Matamalas A., Vidal E., Martínez J., Alomar J., Ramis A., Marco A., Domingo M., Segalés J. (2021) “Neoplastic lesions in domestic pigs detected at slaughter: literature review and a 20-year review (1998-2018) of carcass inspection in Catalonia”. Porcine Health Manag., 7(1), 30.
6. Newman S.J., Rohrbach B. (2012) “Pot-bellied pig neoplasia: a retrospective case series (2004-2011)”. J Vet Diagn Invest., 24(5), 1008-1013.
7. Robinson N.A., Loynachan A.T. (2019) “Cardiovascular and hematopoietic systems” in: Zimmerman J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J. “Diseases of Swine”, 11th ed., Wiley Blackwell, 223–233.
8. Roscoe D.E., Veikley L.R., Mills M. Jr, Hinds L. (1975) “Debilitating ossifying fibromas of a white-tailed deer associated with ear tagging”. J Wildl Dis., 11(1), 62-65.
9. Schoiswohl J., Lambacher B., Klang A., Krametter-Frötscher R. (2019) “Dermal fibrosarcoma in a Cashmere goat. Dermales Fibrosarkom bei einer Kaschmirziege”. Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere., 47(3), 192–195.
10. Vascellari M., Melchiotti E., Mutinelli F. (2006). “Fibrosarcoma with typical features of postinjection sarcoma at site of microchip implant in a dog: histologic and immunohistochemical study”. Vet Pathol., 43(4), 545–548.
11. Waalkes M.P., Rehm S., Kasprzak K.S., Issaq H.J. (1987) “Inflammatory, proliferative, and neoplastic lesions at the site of metallic identification ear tags in Wistar [Crl:(WI) BR] rats”. Cancer Res., 47(9), 2445-2450.

PRRScontrol.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 · www.hipra.com

HUVEPHARMA®
We add performance to your business

Contatto per l'Italia:
Paolo Mondin: 339/7385156
paolo.mondin@huvepharma.com

www.huvepharma.com

HUVEPHARMA EOOD · 3a NIKOLAY HAYTOV STR · 1113 SOFIA · **BULGARIA** · P +359 2 862 5331 · F +359 2 862 5334 · SALES@HUVEPHARMA.COM
HUVEPHARMA N.V. · UITBREIDINGSTRAAT 80 · 2600 ANTWERP · **BELGIUM** · P +32 3 288 1849 · F +32 3 289 7845 · CUSTOMERSERVICE@HUVEPHARMA.COM

LA VIA PER UNO SVEZZAMENTO SENZA OSSIDO DI ZINCO

Soluzioni su misura per incrementare la vostra produttività con la massima protezione

KEMIN®

Scopri come possiamo supportare la tua attività su:
kemin.com/veterinary-solutions

© Kemin Industries, Inc. and its group of companies 2022. All rights reserved. ® ™ Trademarks of Kemin Industries, Inc., U.S.A.
Certain statements, product labeling and claims may differ by geography or as required by government requirements.

LIVISTO

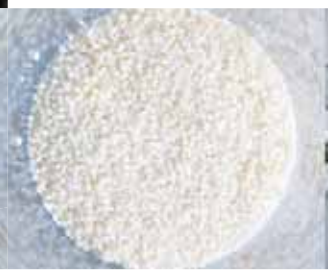
12 Aziende in
9 Paesi che operano con
500 dipendenti in
129 mercati con quasi
100 anni di storia

Il Gruppo **LIVISTO** è attivo nel settore della salute animale, sviluppando e commercializzando prodotti farmaceutici e nutrizionali di alta qualità per animali da reddito e domestici.

TREI S.p.A. è un'azienda farmaceutica italiana fondata nel 1968 con sede a Rio Saliceto (Reggio Emilia) e dal 2014 è entrata a far parte del Gruppo LIVISTO.

Lo stabilimento produttivo di **TREI** è suddiviso in tre aree:

- produzione medicinali veterinari
- produzione medicinali contenenti β-lattamici
- produzione di integratori nutrizionali e mangimi complementari rumino-protetti



I nostri prodotti:

FARMACI

Per animali da reddito e da compagnia

- Medicinali veterinari uso orale
- Premiscele per alimenti medicamentosi
- Medicinali veterinari uso topico e iniettabile
- 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/Piglyx
- Linea inoculi Silierung

IGIENE

- Linea di disinfettanti e detergenti per allevamenti, attrezzature e macelli
- Linea di prodotti per il controllo degli insetti nocivi negli allevamenti: Mosca...Stop!
- Prodotti dermatologici per animali da compagnia

Industria Italiana Integratori TREI S.p.A.
e-mail: trei@treivet.com - Tel: +39 0522 640711

Along with you

livisto.com

IO TENGO AL BENESSERE DEI MIEI ANIMALI.

IO SONO ATTENTO ALLA SALUTE DEI CONSUMATORI.

IO HO A CUORE IL FUTURO DELL'AMBIENTE.

IO LAVORO PER IL MIO FUTURO.

IO IDAL. E TU?

IO IDAL. Si prende cura del tuo mondo.
Passare a IDAL non è solo passare al vaccino senza ago. È il segnale di appartenenza a una comunità che punta al benessere e alla sicurezza degli animali, alla sicurezza degli operatori e alla salute dei consumatori, con attenzione per l'ambiente e per il futuro. Innovazione, iniziative, assistenza, tutorial e tanto di più.

Scansiona il QR CODE,
Idalina ti aspetta con i suoi consigli.

IO IDAL

MSD Animal Health

Selko
Advanced additives, high performance

Selko:
un'offerta completa di additivi a supporto della salute intestinale

Trouw Nutrition Italia

tnitalia@trouwnutrition.com | www.trouwnutrition.it

trouw nutrition
a Nutreco company

VETAGRO®
Like no one else™

Chi ricerca, trova.

vetagro.com

Inquadra il codice
per guardare il nostro
video corporate.

Seguici sui nostri social

RISPETTIAMO LA NATURA, **DI OGNI MAIALE.**

ZOETIS SI IMPEGNA AD ACCRESCERE LA SOSTENIBILITÀ
della produzione di carne suina, proponendo soluzioni innovative
per una alimentazione sicura, di qualità e responsabile.

PER GLI ANIMALI. PER LA SALUTE. PER TE.

zoetis

Le iniziative promosse ed organizzate da SIPAS
per il 2022 si svolgono con il contributo non condizionato di

Boehringer Ingelheim

Ceva

chemifarma

Dopharma

dox-al

Elanco

FATRO

HIPRA

HUVEPHARMA

KEMIN

LIVISTO

MSD Animal Health

trouw nutrition
a Nutreco company

VETAGRO
Like no one else™

zoetis

SEGRETERIA DELEGATA SIPAS

MV CONGRESSI
Meeting & Association Management

Via Marchesi 26 D - 43126 Parma (Italy)
Tel. +39 0521 290191 Fax +39 0521 291314
sipas@mvcongressi.it